

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ВАКЦИН И СЫВОРОТОК  
ИМ. И.И. МЕЧНИКОВА»

*На правах рукописи*

**Файзулов Евгений Бахтиерович**

**БИОЛОГИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ ВИРУСОВ -  
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВАКЦИНОУПРАВЛЯЕМЫХ ИНФЕКЦИЙ**

1.5.10. Вирусология

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

**Научный консультант:**  
Зверев Виталий Васильевич  
доктор биологических наук,  
профессор, академик РАН

Москва – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	17
1.1 Современные молекулярные методы на службе эпидемиологического мониторинга приоритетных вакциноуправляемых вирусных инфекций .....	17
1.1.1 Краткий обзор развития классических методов вирусологии.....	17
1.1.2 Молекулярно-биологические методы исследования в вирусологии .....	20
1.1.3 Генотипирование папилломавирусов человека .....	26
1.1.4 Подходы к генетической характеристике ротавирусов человека .....	30
1.1.5 Методические подходы к генетической характеристике SARS-CoV-2 .....	33
1.2 Биологическое разнообразие и эволюция SARS-CoV-2 в условиях пандемического распространения .....	38
1.3 Методические подходы к аттенуации респираторных вирусов при разработке живых аттенуированных вакцин .....	61
1.3.1 Конструирование вакцинных штаммов для живых гриппозных вакцин .....	61
1.3.2 Подходы к получению вакцинных штаммов вируса краснухи .....	70
1.3.3 Подходы к разработке и потенциал клинического применения живых аттенуированных вакцин против COVID-19.....	74
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	93
2.1 МАТЕРИАЛЫ.....	93
2.1.1. Лабораторные штаммы вирусов .....	93
2.1.2. Панели клинических образцов и изолятов вирусов .....	96
2.1.3. Клеточные линии .....	99
2.1.4. Животные.....	100
2.1.5. Химические реактивы.....	100
2.1.6. Наборы реагентов .....	100
2.1.7. Олигонуклеотиды .....	101
2.2 МЕТОДЫ.....	110
2.2.1 Культивирование клеток млекопитающих.....	110
2.2.2 Культивирование вирусов.....	110
2.2.3 Титрование вирусов по конечной точке ЦПД.....	111
2.2.4 Оценка выживаемости клеток млекопитающих в МТТ-тесте.....	111
2.2.5 Оценка <i>ts</i> фенотипа <i>sa</i> мутантов SARS-CoV-2 <i>in vitro</i> .....	111
2.2.6 Дизайн праймеров и зондов для ПЦР-РВ.....	112
2.2.7 Получение мазков из полости носа для исследования методом ПЦР .....	112

2.2.8	Подготовка фекальных проб для ПЦР-исследования .....	113
2.2.9	Выделение вирусных нуклеиновых кислот.....	113
2.2.10	Реакция обратной транскрипции.....	113
2.2.11	ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.....	114
2.2.12	Выявление вирусной РНК методом ОТ-ПЦР-РВ .....	114
2.2.13	Определение титра вируса краснухи по содержанию вирусной РНК.....	115
2.2.14	Гель-электрофорез ДНК.....	115
2.2.15	Получение положительных контрольных образцов и контрольных образцов чувствительности для лабораторных ПЦР-тест-систем .....	116
2.2.16	Расчет показателей диагностической ценности набора реагентов .....	116
2.2.17	Генотипирование ВПЧ методом ПЦР-РВ .....	117
2.2.18	G/P-генотипирование штаммов РВА методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ.....	117
2.2.19	Установление видовой принадлежности сезонных коронавирусов человека в реакции ОТ-ПЦР-РВ.....	118
2.2.20	Секвенирование генома вируса краснухи .....	118
2.2.21	Аmplификация генных сегментов ротавирусов .....	119
2.2.22	Нанопоровое секвенирование ротавирусного генома.....	119
2.2.23	Нанопоровое секвенирование генома SARS-CoV-2.....	119
2.2.24	Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей.....	120
2.2.25	Тест на иммуногенность вируса краснухи .....	120
2.2.26	Определение антител к SARS-CoV-2 методом твердофазного ИФА.....	120
2.2.27	Определение титра нейтрализующих антител к SARS-CoV-2.....	121
2.2.28	Оценка вирулентности и протективной активности <i>sa</i> мутантов SARS-CoV-2 ....	122
2.2.29	Гистологическое исследование легких.....	123
2.2.30	Трансмиссивная электронная микроскопия.....	123
2.2.31	Статистическая обработка данных.....	124
2.2.32	Соблюдение требований безопасности при работе с вирусами.....	124
2.2.33	Соблюдение этических требований .....	124
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....		126
3.1	РАЗРАБОТКА МЕТОДОЛОГИИ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	126
3.1.1	Разработка на основе метода мультиплексной ПЦР-РВ лабораторных тест-систем для дифференциального выявления широкого спектра возбудителей респираторных и кишечных вирусных инфекций.....	126
3.1.1.1	Разработка тест-системы для дифференциального выявления нуклеиновых кислот 12 групп респираторных вирусов .....	127

3.1.1.2	Разработка тест-системы для дифференциального выявления нуклеиновых кислот основных возбудителей кишечных вирусных инфекций.....	136
3.1.1.3	Участие в международной программе контроля качества молекулярной диагностики QCMD .....	145
3.1.2	Оптимизация условий количественного определения вируса краснухи методом ОТ-ПЦР-РВ .....	147
3.1.3	Конструирование тест-системы для G/P-генотипирования ротавирусов группы А человека методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ.....	150
3.1.4	Разработка нового подхода к генетической характеристике ротавирусов методом нанопорового секвенирования .....	153
3.2	ИССЛЕДОВАНИЕ ВИДОВОГО И СУБВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.....	163
3.2.1	Исследование генетического разнообразия ротавирусов человека на территории московского региона в период с 2009 по 2020 гг. ....	163
3.2.1.1	Ретроспективное исследование этиологии острых вирусных кишечных инфекций в московском регионе в период с 2009 по 2014 гг.....	164
3.2.1.2.	Распределение G/P-генотипов ротавирусов группы А, выявленных в Москве и Московской области в период с 2014 по 2009 гг. ....	167
3.2.1.3	Молекулярно-генетические особенности ротавирусов группы А, выявленных в Москве и Московской области в период с 2015 по 2020 гг.....	175
3.2.2	Исследование генетического разнообразия клинически значимых папилломавирусов, циркулирующих на территории Российской Федерации .....	182
3.2.3	Исследование видового разнообразия сезонных коронавирусов человека, циркулировавших на территории московского региона в период с 2009 по 2014 гг.....	191
3.3	РАЗРАБОТКА НАУЧНЫХ ОСНОВ СОЗДАНИЯ ЖИВЫХ АТТЕНУИРОВАННЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ КРАСНУХИ И COVID-19 .....	194
3.3.1	Выявление фенотипических и генетических маркеров аттенуации вируса краснухи.....	194
3.3.2	Получение и характеристика холодоадаптированных мутантов коронавируса SARS-CoV-2.....	203
3.3.3	Оценка вирулентности, иммуногенности и протективной активности холодоадаптированных штаммов SARS-CoV-2 на животной модели COVID-19 .....	213
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	229
	ВЫВОДЫ.....	232
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	233

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	233
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	235
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	238
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Таксономическая принадлежность и обозначения вирусов, упоминаемых в диссертации .....	299
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Паспорт и регистрационное удостоверение на набор реагентов «ОРВИ-Монитор» .....	303

## ВВЕДЕНИЕ

### *Актуальность темы исследования*

Вакцинопрофилактика является наиболее эффективной мерой снижения заболеваемости и смертности от вирусных инфекций. Благодаря вакцинации в глобальном масштабе была ликвидирована натуральная оспа и сведена к минимуму заболеваемость полиомиелитом, корью, эпидемическим паротитом и краснухой, что свидетельствует о принципиальной возможности элиминации этих заболеваний.

В то же время, опыт массового применения вакцин против ротавирусного энтерита, папилломавирусных заболеваний и COVID-19 показал, что вакцинация защищает человека от тяжелых форм этих заболеваний, но не всегда предохраняет от инфекции и не предотвращает распространения вируса. Возбудителей перечисленных вирусных инфекций характеризует широкое генетическое разнообразие, тенденция к появлению новых антигенных вариантов и дивергенция в процессе эволюции под влиянием различных селективных факторов. Способность к периодическому появлению новых эпидемически значимых геновариантов вирусов определяется высокой изменчивостью вирусного генома, наличием природных резервуаров инфекции, возможностью межвидовой трансмиссии, а для ротавирусов группы А<sup>1</sup> еще и сегментированным характером вирусного генома. Таким образом, элиминация ротавирусной, папилломавирусной и коронарусной инфекции в ближайшее время не представляется возможной, что делает неспецифическую и специфическую профилактику, эпидемиологический мониторинг и совершенствование вакцин в отношении упомянутых заболеваний актуальными задачами в долгосрочной перспективе.

Возможность появления новых патогенных вирусов, в том числе обладающих пандемическим потенциалом, требует от служб эпидемиологического надзора и медицинской науки быть в состоянии постоянной готовности к быстрой разработке диагностических тест-систем, средств лечения и профилактики новых инфекций. Уже в XXI веке мир столкнулся с такими угрозами, как пандемии гриппа А/Н1N1 (2009-2010) и COVID-19 (2020-2023), риск всемирного распространения вируса гриппа птиц (А/Н5N1, А/Н7N9, А/Н3N8 и другие подтипы), коронавирусов SARS-CoV-1 (2003) и MERS-CoV (с 2012 г. по настоящее время), вируса оспы обезьян (с 2022 г. по настоящее время) и ряда других вирусов [1–4].

Глобальное распространение возбудителей вакциноуправляемых вирусных инфекций, преобладание среди них РНК-содержащих вирусов сопряжено с их высоким уровнем генетической изменчивости. Высока вероятность появления геновариантов вирусов, «ускользающих» от естественного и поствакцинального иммунитета, специфических

---

<sup>1</sup> Здесь и далее при упоминании вируса употребляется его общепринятое название. Таксономическая принадлежность и сокращенные названия упоминаемых в диссертации вирусов представлены в Приложении А.

противовирусных препаратов и средств этиологической диагностики, что обуславливает необходимость их периодической корректировки и оптимизации. В связи с этим необходим мониторинг генетического и антигенного разнообразия возбудителей вакциноуправляемых вирусных инфекций. Актуальность диссертации определяется высокой клинической значимостью и убиквитарностью коронавируса, папилломавирусов и ротавирусов группы А, отсутствием соответствующих вакцин в российском национальном календаре иммунизации (НКИ). Важно отметить, что в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ротавирусная и папилломавирусная инфекция относятся к приоритетным вакциноуправляемым инфекциям [5], при этом соответствующие отечественные профилактические вакцины не разработаны, либо находятся на стадии клинических исследований.

Не менее актуальной проблемой фундаментальной и медицинской вирусологии является установление факторов и детерминант вирулентности вирусов и механизмов ее модуляции. Эти знания имеют большое научно-практическое значение для создания живых аттенуированных вакцин, способных активировать не только системный гуморальный и клеточный иммунитет, но также и местный мукозальный иммунитет, обеспечивая стойкий иммунный ответ и перекрестную защиту от разных антигенных вариантов вирусов. Актуальными проблемами российского здравоохранения остается создание отечественных живых аттенуированных вакцин против таких вирусных заболеваний, как краснуха и COVID-19. Важно отметить, что вакцина против краснухи, применяемая в рамках НКИ, основана на зарубежном вакцинном штамме Wistar RA27/3. Несмотря на то, что в мире проводятся соответствующие научные исследования, спустя более чем четыре года с начала пандемии потенциал живых аттенуированных вакцин в профилактике COVID-19 остается нереализованным.

#### ***Степень разработанности темы исследования***

Последние десятилетия XX века ознаменовались бурным развитием методов молекулярной биологии и генной инженерии, многие из которых прочно вошли в практику вирусологических исследований [6]. В эпидемиологическом мониторинге вирусных инфекций молекулярно-биологические методы исследования в первую очередь направлены на выявление, идентификацию и установление субвидовой таксономической принадлежности возбудителя [6; 7]. Молекулярные методы отличаются высокой информативностью, чувствительностью, специфичностью и быстротой проведения анализа [8]. Благодаря развитию молекулярных методов были открыты многие новые клинически значимые вирусы, расширились возможности таксономической характеристики вирусов, этиологической диагностики и эпидемиологического мониторинга вирусных инфекций [8–10]. Особую практическую ценность молекулярные методы исследования представляют для характеристики возбудителей вакциноуправляемых

вирусных инфекций, поскольку получаемые данные могут быть использованы для решения задач, связанных с контролем распространения этих заболеваний. В связи с вышеизложенным, в задачи диссертации входило совершенствование молекулярно-биологических методов выявления и генетической характеристики возбудителей вирусных инфекций, а также исследование биологического разнообразия ротавирусов, папилломавирусов и коронавирусов человека, циркулирующих на территории Российской Федерации (РФ).

Историческим подходом к созданию живых вакцин является использование в качестве вакцинного штамма авирулентного для человека вируса животных, филогенетически близкого возбудителю заболевания человека. Классическими примерами такого подхода, называемого «дженнеровским», являются вирус коровьей оспы и вирус осповакцины (предполагаемый хозяин - лошадь), применявшиеся для профилактики натуральной оспы [11; 12]. Другой традиционный подход заключается в получении мутантов вируса путём его длительного пассирования в культуре клеток в селективных условиях – например, при пониженной температуре и/или в клетках другого хозяина (вакцины против кори, краснухи, эпидемического паротита, полиомиелита, ветряной оспы) [13–16]. На современном этапе для аттенуации вируса все чаще используют методы генной инженерии и обратной генетики, позволяющие целенаправленно изменять геном вируса, «выключая» геномные детерминанты вирулентности вирусов, либо снижая эффективность процессов транскрипции вирусного генома или трансляции вирусной РНК (модификация промоторов вирусных генов, деоптимизация кодонов) [17; 18]. Есть также примеры живых вакцин, созданных в результате сочетания традиционных и современных методов, как, например, ротавирусная вакцина, полученная путем реассортации ротавируса коров и ротавирусов человека [19].

Несмотря на достигнутый прогресс в «управлении» вирулентностью вирусов, в процессе разработки и применения живых вирусных вакцин сохраняются проблемы. Получение вакцинного штамма требует не только глубоких знаний биологии возбудителя, его антигенного разнообразия и взаимоотношений с хозяином на уровнях *in vitro* и *in vivo*, но и тщательных эмпирических доказательств его безопасности, иммуногенности, протективной активности и стабильности аттенуационного генотипа и фенотипа. В связи с этим, в задачи диссертации входила разработка научных основ создания живых аттенуированных вакцин против краснухи и COVID-19, включая получение аттенуированных мутантов вируса, выявление вероятных маркеров и детерминант их аттенуации, оценку иммуногенности и протективной активности на животных моделях.

### ***Цель и задачи исследования***

**Цель** диссертационного исследования – оценка генетического разнообразия возбудителей приоритетных вакциноуправляемых вирусных инфекций и создание научной основы для оптимизации профилактических вирусных вакцин.



Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие **задачи**:

1. На основе мультиплексных реакций обратной транскрипции (ОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) разработать тест-системы для дифференциального выявления широкого спектра возбудителей острых респираторных и кишечных вирусных инфекций (ОРВИ и ОКИ), включая вирусы гриппа А и В (ВГрА и ВГрВ), вирусы парагриппа 1, 2, 3, 4 типов (ВПГ-1, ВПГ-2, ВПГ-3, ВПГ-4), аденовирусы (АДВ), бокавирусы (БВ), респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), риновирусы (РВ), энтеровирусы (ЭВ), коронавирусы (КВ), ротавирусы групп А и С (РВА и РВС), норовирусы (НВ), саповирусы (СВ), астровирусы (АВ), полиовирусы (ПВ), вирусы гепатита А и Е (ВГА и ВГЕ), орторевовирусы млекопитающих (ОРВ), вирус краснухи.

2. Разработать на основе методов мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ и нанопорового секвенирования (НПС) методические подходы к генетической характеристике ротавирусов группы А человека.

3. Исследовать распространенность разных G/P-генотипов ротавирусов группы А человека, циркулирующих на территории московского региона.

4. Исследовать распространенность разных генотипов папилломавирусов человека высокого и низкого онкогенного риска на территории РФ.

5. Исследовать видовое разнообразие коронавирусов человека, циркулирующих на территории московского региона.

6. Выявить вероятные генетические и фенотипические маркеры аттенуации холодоадаптированного (*ca*, cold-adapted) варианта штамма С-77 вируса краснухи, полученного ранее в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова).

7. Получить *ca* мутанты коронавируса SARS-CoV-2 и определить вероятные генетические и фенотипические маркеры их аттенуации.

8. На животной модели COVID-19 оценить вирулентность, иммуногенность и протективную активность *ca* мутантов SARS-CoV-2.

#### ***Научная новизна исследования***

1. Разработана не имеющая аналогов методика специфической ПЦР-амплификации сегментированного ротавирусного РНК-генома для последующей полногеномной характеристики ротавирусов человека методом нанопорового секвенирования. Экспериментально обоснована высокая эффективность предложенного подхода для генетической характеристики штаммов ротавирусов, относящихся к разным эволюционным линиям (Wa-, DS-1- и AU-1-подобные).

2. Установлена ключевая роль ротавирусов группы А в госпитализации с острым гастроэнтеритом и внутрибольничного заражения в период с 2009 по 2014 гг. детей в возрасте до 5 лет в условиях стационаров г. Москвы. Определена динамическая структура G/P-генотипов ротавирусов группы А человека, циркулировавших в московском регионе в период с 2009 по 2020 гг. Показано, что в период 2009-2014 гг. доминирующим генотипом являлся G4P[8], выявленный в 48,2% случаев, тогда как частота выявления генотипов G1P[8], G2P[4], G3P[8], G9P[8] была значительно ниже и варьировала от 14,7% до 4,1%. В период с 2015 по 2020 гг. в регионе снизилась частота встречаемости генотипа G4P[8]I1 (с 39% до 9%) и выросла доля генотипа G9P[8]I1 (с 6% до 37%) по сравнению с периодом 2009-2014 гг. В период с 2018 по 2020 гг. выявлена циркуляция не встречавшегося ранее DS-1-подобного реассортантного PBA G3P[8]I2 (более 20%), широко распространившегося в мире в последние годы. Для штамма с генотипом G4P[6]I1 установлена тесная филогенетическая связь с ротавирусами свиней [594].

3. Получены приоритетные данные о циркуляции на территории РФ всех известных сезонных коронавирусов человека - Human coronavirus NL63 (HCoV-NL63), Human coronavirus 229E (HCoV-229E), Human coronavirus OC43 (HCoV-OC43) и Human coronavirus HKU1 (HCoV-HKU1). Установлено, что у детей в возрасте до 5 лет коронавирусы HCoV-OC43 и HCoV-NL63 могут являться причиной тяжелых респираторных заболеваний, требующих госпитализации.

4. В геноме аттенуированного мутанта штамма С-77 вируса краснухи выявлен набор мутаций, возникших в процессе культивирования и адаптации вируса к новому хозяину (культура клеток почки обезьян Vero) и росту при пониженной температуре (33°C), определяющие его *ca* и аттенуационный (*att*, attenuative) фенотип. В том числе, выявлено 4 уникальные аминокислотные замены - Tyr1042Cys и Ser1106Thr в протеазном домене открытой рамки считывания (ORF) неструктурных белков и Leu27Phe и Ala564Thr в доменах ORF С-белка и E2-белка, соответственно, роль которых в аттенуации штамма С-77 представляется ключевой.

5. Путем холодной адаптации в культуре клеток почки обезьяны Vero получены не имеющие отечественных аналогов аттенуированные мутанты Ухань-подобного штамма SARS-CoV-2 Dubrovka. На основе вирусологических и молекулярно-биологических методов разработаны подходы к оценке генетической и фенотипической стабильности аттенуированных мутантов, заключающиеся в определении у них набора мутаций, ответственных за проявление аттенуационного фенотипа, и выявлении *in vitro* наличия *ca/ts* фенотипа и способности заражать клетки легких человека. На животной модели коронавирусной пневмонии установлена высокая иммуногенность и протективная активность *ca* вариантов SARS-CoV-2. Таким образом, разработаны научные основы аттенуации SARS-CoV-2 и получения кандидатных вакцинных штаммов для создания живой аттенуированной вакцины против COVID-19.

### *Теоретическая и практическая значимость работы*

Дано экспериментальное обоснование высокой диагностической эффективности применения метода мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ для дифференциального выявления широкого спектра возбудителей острых респираторных и кишечных вирусных инфекций. На основе метода мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ разработаны экспериментальные тест-системы для этиологической диагностики острых респираторных и кишечных вирусных инфекций и генотипирования ротавирусов группы А. Разработанные тест-системы могут применяться как в научных исследованиях, так и для быстрой расшифровки вспышек ОРВИ и острых гастроэнтеритов (ОГЭ) и эпидемиологического мониторинга вирусных инфекций. По мере разработки и внедрения специфических препаратов для лечения респираторных и кишечных вирусных заболеваний, подобные тест-системы найдут более широкое применение и в клинической практике для постановки этиологического диагноза и назначения адекватного лечения. Способы дифференциальной диагностики ОРВИ и ОКИ, нуклеотидные последовательности вирусоспецифичных праймеров и зондов защищены патентами РФ RU2460803C2 и RU2506317C2 [20; 21]. Набор реагентов «ОРВИ-Монитор» приказом Росздравнадзора от 19 марта 2012 года № 1211-Пр/12 разрешен к производству, продаже и применению на территории РФ (регистрационное удостоверение № ФСР 2012/13218) (Приложение Б).

В исследовании разнообразия сезонных коронавирусов человека, циркулирующих в московском регионе, подтвержден тезис об убиквитарности коронавирусов HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 и HCoV-NKU1. Установлена этиологическая роль коронавирусов HCoV-OC43 и HCoV-NL63 в возникновении у детей в возрасте до 5 лет тяжелых респираторных заболеваний, требующих госпитализации.

Разработанные методические подходы к генетической характеристике ротавирусов представляют собой эффективные инструменты эпидемиологического мониторинга ротавирусной инфекции, а также могут стать основой методов контроля подлинности и специфической активности при производстве ротавирусной вакцины. Полученные данные о генетической структуре ротавирусов, выявляемых на обследуемой территории, представляют ценность при выработке рекомендаций по составу отечественной ротавирусной вакцины. Анализ разнообразия циркулирующих геновариантов ротавирусов позволил установить важную роль ротавирусов животных и межвидовой передачи в появлении патогенных для человека ротавирусов, имеющих эпидемический потенциал.

Понимание распространенности папилломавирусов человека (ВПЧ) на территории РФ важно для прогнозирования эффективности специфической профилактики заболеваний, вызванных ВПЧ высокого и низкого онкогенного риска, вакцинами разного состава. В России

вакцинопрофилактика ВПЧ-инфекции проводится зарубежными вакцинными препаратами. В связи с этим полученные результаты представляют интерес для разработчиков отечественных ВПЧ-вакцин, поскольку позволяют определять их состав с учетом региональных особенностей распространенности различных типов ВПЧ.

На различных этапах пандемии из клинических образцов от пациентов с COVID-19 в культуре клеток были изолированы штаммы SARS-CoV-2 и установлена их субвидовая таксономическая принадлежность к разным эпидемически значимым вариантам вируса, включая Ухань-подобный, Delta и Omicron. Охарактеризованные культуральные изоляты SARS-CoV-2 представляют собой ценность при проведении вирусологических исследований, а также при разработке средств диагностики, специфической профилактики и лечения COVID-19.

Определены факторы и маркеры аттенуации вирусов краснухи и SARS-CoV-2. В частности, установлено, что штамм С-77 вируса краснухи в процессе культивирования и адаптации к новому хозяину (культура клеток почки обезьян Vero) и росту при пониженной температуре (+33°C) приобрел аттенуационный фенотип, детерминируемый рядом уникальных мутаций, не встречающихся у диких штаммов вируса. Выявленные уникальные аминокислотные замены, вероятно, играют ключевую роль в приобретении вирусом краснухи *att* фенотипа.

Установлено, что адаптация SARS-CoV-2 к выращиванию в культуре клеток Vero при пониженной температуре (+23°C) приводит к аттенуации вируса для золотистых сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*). Показано, что наличие температурочувствительного (*ts*, temperature sensitive) фенотипа является не единственным условием для аттенуации вируса, поскольку в снижении вирулентности вируса важную роль играет также смена хозяина, что сопровождается утратой мутантным вирусом способности заражать клетки легких человека *in vitro* [635].

Полученные результаты демонстрируют, что холодовая адаптация вирусов краснухи и SARS-CoV-2, проводимая в клетках почки обезьяны Vero, является эффективной стратегией аттенуации этих вирусов. Разработанные методические подходы к выявлению маркеров аттенуации упомянутых вирусов в условиях *in vitro* могут быть использованы в дальнейшем для контроля стабильности фенотипа и генотипа вакцинных штаммов вируса в технологии производства живых аттенуированных вакцин. Таким образом, разработаны принципы получения аттенуированных штаммов вирусов краснухи и SARS-CoV-2, которые по своим биологическим свойствам могут рассматриваться в качестве кандидатов для разработки на их основе живой аттенуированной вакцины.

В процессе выполнения диссертации было получено и депонировано в базе данных GenBank 160 полных или частичных последовательностей геномов вирусов краснухи, ротавирусов группы А, коронавируса SARS-CoV-2.

#### ***Методология и методы исследования***

Выявление и идентификацию вирусов, исследование видового и субвидового разнообразия возбудителей приоритетных вакциноуправляемых вирусных инфекций проводили с использованием молекулярно-биологических методов, включая видоспецифическую или типоспецифическую ПЦР-РВ и секвенирование генов протективных белков. При дизайне вирусоспецифических олигонуклеотидов и установлении таксономической принадлежности вирусов использовали биоинформатические методы и специализированное программное обеспечение. Генетическую характеристику вирусов проводили методами секвенирования по Сэнгеру и/или нанопорового секвенирования. Изоляцию и накопление вирусов проводили в соответствующих чувствительных культурах клеток млекопитающих. Атенуацию SARS-CoV-2 проводили путем длительного пассирования вируса при постепенно понижаемой температуре в клетках другого хозяина (Vero) с получением *sa* мутантов. Иммуногенность *sa* мутантов вирусов краснухи и SARS-CoV-2 определяли в экспериментах по иммунизации кроликов и золотистых сирийских хомячков, соответственно, путем оценки титра суммарных и нейтрализующих антител к вирусу. Вирулентность и протективную активность *sa* мутантов SARS-CoV-2 определяли на золотистых сирийских хомячках по таким критериям, как клинические особенности заболевания, изменение веса животных, уровень вирусной репродукции в легких, мозге и других органах, гистопатологические изменения в легких. Уровень вирусной репродукции в зараженных клетках и органах зараженных животных определяли методами титрования вируса по конечной точке цитопатического действия (ЦПД) и количественной ОТ-ПЦР-РВ. При обработке получаемых данных, сравнении результатов экспериментов использовали статистические методы и специализированное программное обеспечение.

#### ***Положения, выносимые на защиту***

1. В период с 2009 по 2014 гг. основной причиной госпитализации с острым гастроэнтеритом в стационары г. Москвы и внутрибольничной кишечной инфекции у детей в возрасте до 5 лет являлись ротавирусы группы А. Основными тенденциями изменений генетической структуры ротавирусов, циркулировавших в регионе в период 2009 по 2020 гг., было снижение частоты встречаемости генотипа G4P[8]I1 (с 39% до 9%), увеличение доли генотипа G9P[8]I1 (с 6% до 37%), а также появление и распространение в период 2018-2020 гг. не встречавшегося ранее DS-1-подобного реассортантного ротавируса с генотипом G3P[8]I2 (до

24%). Важную роль в возникновении эпидемически значимых вариантов ротавирусов человека играют ротавирусы животного происхождения.

2. На территории Российской Федерации циркулируют и широко представлены папилломавирусы высокого онкогенного риска ВПЧ16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 и низкого онкогенного риска ВПЧ6, 11, 44. Доминирующими в структуре выявленных случаев ВПЧ-инфекции являются ВПЧ16 - 13,8%, ВПЧ6 - 10,7%, ВПЧ51 - 6,8%, ВПЧ44 - 6,8%, ВПЧ53 - 6,3%, ВПЧ31 - 5,6%, ВПЧ56 - 5,5%, ВПЧ52 - 5,4%.

3. На территории московского региона циркулируют коронавирусы человека HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 и HCoV-NKU1. У детей в возрасте до 5 лет коронавирусы HCoV-OC43 и HCoV-NL63 могут являться причиной тяжелых респираторных заболеваний, требующих госпитализации.

4. Обладающий *sa* фенотипом мутант штамма С-77 вируса краснухи в процессе холодной адаптации в клетках нового хозяина приобрел 13 нуклеотидных замен, из которых 6 несинонимичных, в том числе 4 уникальных, которые играют ключевую роль в приобретении вирусом *sa* и *att* фенотипа. *Sa* вариант штамма С-77 по своим биологическим свойствам может рассматриваться в качестве кандидата для разработки на его основе отечественной вакцины против краснухи.

5. Адаптация SARS-CoV-2 к выращиванию в культуре клеток Vero при пониженной температуре (+23°C) приводит к его аттенуации. В снижении вирулентности вируса важную роль играет как приобретение им *ts* фенотипа, так и адаптация к размножению в клетках нового хозяина, сопряженная со снижением инфекционности вируса по отношению к клеткам человека.

6. Холодовая адаптация SARS-CoV-2 в культуре клеток почки обезьян Vero является эффективной стратегией получения аттенуированных штаммов вируса, обладающих высокой иммуногенностью и протективной активностью. Однократная интраназальная иммунизация золотистых сирийских хомячков *sa* мутантами SARS-CoV-2 вызывает сероконверсию с выработкой вируснейтрализующих антител и защищает животных от продуктивной инфекции и развития тяжелой пневмонии при экспериментальном заражении вирулентным штаммом.

#### ***Личный вклад автора***

Личный вклад автора заключался в разработке методологии, планировании, организации и проведении экспериментальных исследований, систематизации и анализе полученных результатов, оформлении результатов в виде публикаций и научных докладов. Основная часть экспериментальных работ была выполнена в лаборатории прикладной вирусологии на базе отдела вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. Отдельные эксперименты и исследования были проведены в сотрудничестве с ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М. Ф. Владимирского»,

отделение детских инфекций (клинический материал для исследований); Московским научно-исследовательским онкологическим институтом имени П.А. Герцена – филиалом ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, отделение экспериментальной фармакологии и токсикологии (гистологическое исследование легких хомячков); Московским государственным университетом им. М.В. Ломоносова, кафедра биоинженерии биологического факультета (трансмиссивная электронная микроскопия); Институтом вирусологии им. Д.И. Ивановского, входящим в состав ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (охарактеризованный клинический материал для исследований), ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) (охарактеризованный клинический материал для исследований). Имена соавторов указаны в научных публикациях по теме диссертации.

При написании разделов диссертации 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.2.3, 3.3.1 использованы материалы шести кандидатских диссертаций по специальности 1.5.10. Вирусология, выполненных в ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова под научным руководством и при личном участии Файзулова Е.Б., включая диссертации Оксанича А.С. (2008), Никоновой А.А. (2008), Лободанова С.А. (2013), Аммура Ю.И. (2012), Дмитриева Г.В. (2012), Бахтоярова Г.Н. (2016). Ссылки на соответствующие работы приведены в списке литературы [22–27].

#### ***Степень достоверности и апробация результатов***

Достоверность экспериментальных данных обеспечена использованием обширного комплекса современных методов исследования и статистического анализа, корректных положительных и отрицательных контролей, проверкой воспроизводимости результата в независимых экспериментах, критической оценкой полученных результатов при сравнении с данными современной научной литературы.

По материалам диссертации сделано более 30 докладов на научных конференциях и конгрессах. В том числе результаты работы были представлены к обсуждению научным сообществом на российских и международных конференциях и симпозиумах: II Российский конгресс по медицинской микробиологии и инфектологии (29 февраля - 1 марта 2024 г., Москва); IV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (12–13 октября 2023 г., Москва), XII Съезд Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (26–28 октября 2022 г., Москва); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (7 - 8 октября 2021 г., Москва); X Юбилейная международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика 2021» (09-11 ноября 2021 г., Москва); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020» (6–8 октября 2020 г., Москва);

5 Российский конгресс лабораторной медицины (11-13 сентября 2019 г., Москва); VI Международная конференция, посвященная Дню ДНК-2019 «Современные биотехнологии для науки и практики» (25-26 апреля 2019 г., Санкт-Петербург); Международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика 2018» (27-28 сентября 2018 г., Минск); European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress (26-30 мая 2018 г., Мюнхен, Германия); IX Всероссийская научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика - 2017» (18-20 апреля 2017 г., Москва); VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2014» (18-20 марта 2014 г., Москва); 6th European Congress of Virology (19-22 октября 2016 г., Гамбург, Германия); VII Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням с международным участием (30 марта - 1 апреля 2015 г., Москва) и другие.

#### ***Публикации по теме диссертации***

По теме диссертационного исследования опубликовано 35 научных работ, из них статей, опубликованных в Перечне рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук (Перечень ВАК), а также индексируемых в международных базах Scopus, Springer, RSCI - 33. Получено патентов на изобретение РФ – 2.

#### ***Соответствие диссертации паспорту научной специальности***

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.10. Вирусология. Результаты проведенного исследования соответствуют направлениям исследований: пунктам 6, 7, 10 и 11 паспорта специальности 1.5.10. Вирусология.

#### ***Структура и объем работы***

Диссертационная работа включает введение, три главы основной части, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений, список литературы, 2 приложения. Работа изложена на 305 страницах, содержит 61 рисунок, 46 таблиц, 640 источников литературы.



## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Современные молекулярные методы на службе эпидемиологического мониторинга приоритетных вакциноуправляемых вирусных инфекций

#### 1.1.1 Краткий обзор развития классических методов вирусологии

Человечество на протяжении всей истории сопровождают вирусы и вызываемые ими заболевания. Первые упоминания о заболеваниях вирусной природы, похожих по описанию на натуральную оспу, полиомиелит, эпидемический паротит и другие заболевания, сделаны в древних рукописях и памятниках культуры еще до нашей эры. Возможность специфической профилактики вирусных заболеваний известна еще со времен раннего средневековья (вариоляция) [12], но научный подход к решению проблемы впервые применил английский врач Эдвард Дженнер (Jenner E.) в 1796 году, разработав на основе вируса коровьей оспы первую вакцину [11]. Труды Дженнера совершили настоящую революцию в естествознании и медицине, поскольку в то время преобладало мнение, что такие заболевания, как натуральная оспа, вызываются факторами окружающей среды, а не специфическими микроскопическими агентами.

Предвестником открытия самих вирусов стали работы Луи Пастера (Pasteur L.), который в 1885 году разработал технику аттенуации вируса бешенства и экстренной вакцинопрофилактики этого особо опасного заболевания [28]. Этиология вирусных болезней и природа вирусов стали проясняться с развитием микробиологических методов исследования. Если открытие бактерий стало возможным после создания в 1676 году Антони ван Левенгуком (van Leeuwenhoek A.) первого микроскопа, то обнаружить вирусы не удавалось еще более двух последующих столетий из-за их субмикроскопического размера [9]. Открытию вирусов способствовала разработка в конце XIX века фарфоровых ультрафильтров, изготовленных для лаборатории Пастера и используемых для стерилизации воды и других жидкостей. Используя микробиологические методы исследования, Дмитрий Иосифович Ивановский показал, что возбудитель мозаичной болезни табака (ныне известный как вирус табачной мозаики), проходит через фильтры, удерживающие бактерии, при этом не растет на искусственных питательных средах [29]. В 1892 году вышла статья Ивановского Д.И. «О двух болезнях табака. Табачная пепелица, мозаичная болезнь», положившая начало новой науке – вирусологии [9, 29]. В 1897 году Фридрих Леффлер и Поль Фрош (Loeffler F., Frosch P.) установили вирусную этиологию первого заболевания млекопитающих - ящура крупного рогатого скота, обнаружив, что возбудитель проходит через ультрафильтр Chamberland, но не через более тонкий ультрафильтр Kitasato [9]. Таким образом, они подтвердили правоту Ивановского Д.И., полагавшего, что вирусы представлены субмикроскопическими частицами, но не «инфекционной жидкостью», как считал Мартинус Бейеринк (Beijerinck M.), первым начавший

применять термин «вирус» (от лат. *virus* - яд) [30]. Бактериальная фильтрация еще длительное время оставалась базовым методом установления вирусной природы инфекционных заболеваний (Рисунок 1).

Впоследствии развитие вирусологии определялось появлением новых «прорывных» методов исследования. Революционными вехами в развитии вирусологических методов стало открытие в 1931 г. возможности размножения вируса натуральной оспы в куриных эмбрионах Эрнестом Гудпасчуром и Элис Вудроф (Goodpasture E., Woodruff A.) и в 1949 г. - выращивания широкого спектра вирусов в монослойных культурах клеток Джоном Эндерсом, Томасом Уэллером и Фредериком Роббинсом (Enders J., Weller T., Robbins F.) [9, 31]. Разработка живых систем изоляции и культивирования вирусов позволила в 50-60 гг. XX века добиться впечатляющих успехов в установлении вирусной этиологии десятков инфекционных заболеваний человека и животных (Рисунок 1) и наработке нативного вирусного антигена для производства диагностических тест-систем и профилактических вакцин [9; 31]. Размножение вирусов в чувствительных культурах клеток лежит в основе таких незаменимых классических вирусологических методов, как реакция нейтрализации, гемадсорбция, иммунофлуоресценция, титрование вирусов по ЦПД и в реакции бляшкообразования и др. [6]. Чувствительные для вирусов культуры клеток широко применяются в качестве модельных систем для оценки специфической активности противовирусных препаратов *in vitro*, сохраняют свою актуальность в области эпидемиологических научных исследований и эпидемиологического мониторинга. Однако у культурального метода есть важное ограничение – ряд вирусов с трудом поддаются культивированию, тогда как некоторые вирусы не удалось изолировать в культуре клеток до настоящего времени (вирус гепатита С, папилломавирусы, норовирусы и др.) [9].

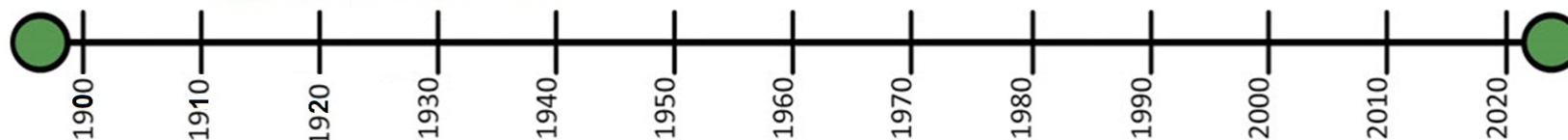
Некоторые из не поддающихся культивированию вирусов были открыты благодаря развитию прямых методов выявления вирусов – трансмиссивной электронной микроскопии (ТЭМ), иммунохимических и молекулярно-биологических методов. В 1941 г. Anderson T. с соавт. впервые применил недавно разработанный электронный микроскоп для визуализации вирусов [32]. Более того, в 1941 г. эти ученые опубликовали данные о визуализации продуктов взаимодействия вируса и сыворотки, содержащей антитела к этому вирусу, на основе чего в конце 60-х гг. был разработан метод иммуноэлектронной микроскопии [33]. Метод ТЭМ позволил открыть много патогенных для человека вирусов, в том числе возбудителей острых гастроэнтеритов и гепатитов – норовирусов (1972 г.), ротавирусов (1973 г.), астровирусов (1975 г.), вирусов гепатита А, В и Е (1970, 1973 и 1983 г., соответственно) (Рисунок 1) [34–38].

## Установление фильтрующейся природы возбудителя

Вирус табачной мозаики 1892  
Вирус ящура 1898  
Вирус желтой лихорадки 1900  
Вирус Денге 1907  
Полиовирус 1909  
Вирус кори 1911  
Вирус гриппа 1918-1919  
Вирус простого герпеса 1919

## Иммуноэлектронная микроскопия

Вирус гепатита В 1970  
Норовирус 1972  
Вирус гепатита А 1973  
Ротавирус 1973  
Астровирус 1975  
Вирус гепатита Е 1983



Эховирус 1951  
Аденовирус 1953  
Реовирус 1953  
Риновирус 1953  
РСВ 1956  
Вирус парагриппа 1956  
Коронавирус 229Е 1966  
Коронавирус ОС-43 1967  
ВИЧ-1 1983

Вирус гепатита С 1989  
Метапневмовирус 2001  
SARS-CoV 2003  
Коронавирус NL-63 2004  
Коронавирус HKU1 2005  
Бокавирус 2005  
Риновирус С 2006  
Полиомавирусы KI, WU, MC 2007  
MERS-CoV 2012  
SARS-CoV-2 2019

## Изоляция в культуре клеток

## Клонирование и секвенирование вирусного генома

На временной шкале отмечены патогенные для человека вирусы и год опубликования результатов с обоснованием вирусной природы и этиологической роли возбудителя.

Рисунок 1 - Методические подходы, сыгравшие решающую роль в открытии патогенных для человека вирусов

Важной вехой в развитии вирусологической методологии стала разработка в 1971 г. Евой Энгвалл и Питером Перлманном (Engvall E., Perlmann P.) метода твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) и его адаптация к решению задач вирусологии и лабораторной диагностики вирусных инфекций [39; 40]. Возможности ИФА в антигенной характеристике и идентификации вирусов значительно возросли с разработкой в 1975 г. Цезарем Мильштейном и Георгом Кёлером (Köhler G., Milstein C.) технологии получения моноклональных антител [41].

### **1.1.2 Молекулярно-биологические методы исследования в вирусологии**

Особую ценность для вирусологии имеют прямые методы исследования, направленные на узнавание структурных элементов вирусов, в том числе молекулярно-биологические методы (молекулярные методы), назначением которых является выявление и характеристика вирусных геномов. На стыке тысячелетий молекулярные методы сыграли важнейшую роль в развитии вирусологии и вакцинопрофилактики вирусных инфекций.

Начиная с 1980 гг., методы изоляции вирусов в культуре клеток и иммуноэлектронной микроскопии практически исчерпали свой потенциал обнаружения новых вирусов. Только с развитием молекулярно-биологических методов (клонирование вирусных геномов, амплификация нуклеиновых кислот, секвенирование ДНК) удалось обнаружить и идентифицировать новые патогенные вирусы, с трудом поддающиеся культивированию - вирус гепатита С (1989 г.) [42], метапневмовирус (2001 г.) [43], коронавирусы NL-63 (2004) и HKU1 (2005 г.) [44], бокавирусы [45], риновирус С, представленный более чем 50-ю генотипами (2006 г.) [46; 47], полиомавирусы KI, WU, MC (2007 и 2008 г.) [48] и другие (Рисунок 1). Быстрое установление таксономической принадлежности новых коронавирусов с пандемическим потенциалом - SARS-CoV-1 (2003 г.), MERS-CoV (2012 г.), SARS-CoV-2 (2019 г.) стало также возможным благодаря применению методов секвенирования второго и третьего поколения (Рисунок 1).

Еще в 1970-е годы XX века, благодаря открытию эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз), была показана ценность молекулярных методов для решения проблем молекулярной генетики и вирусологии (Nathans D., Arber W., Smith H.) [49; 50]. Рестриктазы нашли применение не только в характеристике ДНК на основе длин рестриктных фрагментов, но и в технологии рекомбинантной ДНК и молекулярного клонирования, основы которой заложили Поль Берг (Berg P.) с соавт. [51].

«Классическая» стратегия молекулярного клонирования включает несколько стадий, в том числе накопление и очистку геномной ДНК, ее расщепление рестриктазами с последующим лигированием АТФ-зависимой ДНК-лигазой с выбранным плазмидным вектором, который

затем вводят в компетентные бактериальные клетки путем трансформации, выращивают на селективной агаровой среде и проводят скрининг клонов для обнаружения желаемого варианта интеграции фрагмента ДНК. Символично, что первая рекомбинантная молекула ДНК состояла из фрагментов геномов вируса бактерий и вируса млекопитающих - в геном вируса обезьян SV-40 был встроен фрагмент генома бактериофага лямбда [51]. Первая полноразмерная геномная последовательность также была определена для вируса – бактериофага φX174 (5,386 нуклеотидов). Исследование выполнено Фредериком Сэнгером (Sanger F.), двукратным лауреатом Нобелевской премии, внесшим наиболее весомый вклад в развитие методов секвенирования белков и нуклеиновых кислот (НК). Так в процессе бактериологических и вирусологических исследований зарождались такие дисциплины, как молекулярная биология и молекулярная генетика [52–54].

Предвестником появления современных подходов к детекции, идентификации и генетической характеристике вирусов была разработка методов электрофореза НК в агарозном или полиакриламидном геле и гибридизации НК [7]. Эдвин Саузерн (Southern E.) предложил метод переноса ДНК после электрофореза на фильтры с последующей гибридизацией иммобилизованных молекул со специфическими радиоактивно-мечеными ДНК-зондами, получивший название Саузерн-блоттинг по фамилии автора [55]. Выявление результата при этом проводится методом радиоавтографии. Впоследствии была разработана модификация метода - Нозерн-блоттинг, или РНК-блоттинг, чаще всего используемый в молекулярно-биологических исследованиях для изучения экспрессии генов путем обнаружения в образце РНК [56]. До 1982 года методы гибридизации НК основывались на использовании зондов, меченных радиоактивными изотопами (например,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^3\text{H}$ ). Впоследствии стали применяться альтернативные варианты нерадиоактивных меток, таких как биотин, дигоксигенин, флуоресцентные и хемолюминесцентные вещества. Эти метки не обеспечивают столь высокой чувствительности, как изотопные, но выгодно отличаются тем, что их можно использовать в лабораториях, не имеющих допуска для работы с изотопами [7].

Уникальность нуклеотидных последовательностей вирусных геномов определяет узнавание мечеными зондами комплементарной НК-мишени и обеспечивает методам молекулярной гибридизации высокую специфичность. Радикально повысить чувствительность гибридизационных методов позволило широкое внедрение в практику научных исследований и лабораторной диагностики инфекционных заболеваний метода ПЦР, разработанного Керри Мюллисом (Mullis K.B.) с соавт. [57]. ПЦР и другие методы амплификации НК сочетают высокую специфичность, присущую гибридизационным методам, и непревзойденную чувствительность. Сложно представить себе современное научное исследование медико-биологической направленности, где не применялся бы один из амплификационных методов.

Метод ПЦР благодаря своей универсальности, высокой специфичности и чувствительности нашел широкое применение в эпидемиологическом мониторинге вирусных инфекций и стал «золотым стандартом» молекулярной диагностики многих инфекционных заболеваний, как в медицине, так и в ветеринарии [58].

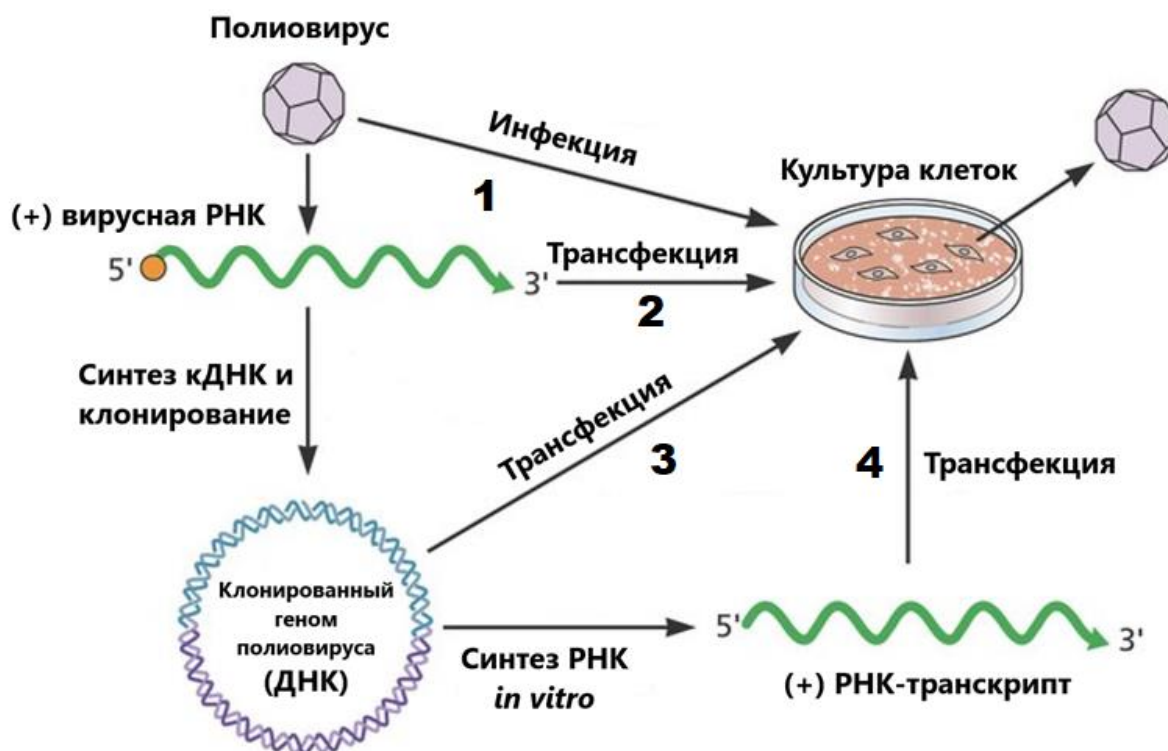
С появлением в начале 1980-х годов методов амплификации и секвенирования НК вирусологические исследования вышли на качественно новый методический уровень. Благодаря развитию молекулярных методов были открыты многие клинически значимые вирусы, расширились возможности таксономической характеристики вирусов, этиологической диагностики и эпидемиологического мониторинга вирусных инфекций [8–10]. Особую практическую ценность молекулярные методы исследования представляют для характеристики возбудителей вакциноуправляемых вирусных инфекций, поскольку получаемые данные могут быть использованы для решения задач, связанных с контролем распространения этих инфекций. Современный уровень эпидемиологического мониторинга невозможен без применения молекулярно-генетических методов. Молекулярные методы также очень востребованы на этапах разработки вакцин для количественной оценки вируса, контроля стабильности генотипа и фенотипа вакцинных штаммов вируса, выявления контаминации клеточных культур и вакцинных препаратов возбудителями инфекционных заболеваний и в ряде других случаев.

Важнейшими характеристиками молекулярных методов, определяющими их высокую ценность, является универсальность, высокая чувствительность и специфичность [6]. Универсальность молекулярных методов определяется тем, что стандартные процедуры молекулярно-генетического исследования вирусов (амплификация НК, секвенирование генома и т.д.) возможны для всех без исключения вирусов. Применяемые в молекулярных методах химические реактивы и ферменты общедоступны, при этом возможен быстрый дизайн, корректировка и синтез вирусоспецифичных олигонуклеотидов, определяющих «узнавание» вирусного генома. Для сравнения, эффективность, а в ряде случаев и сама возможность применения классических методов вирусологии (культуральные, серологические, иммунохимические методы), зависит от способности вирусов к размножению в тех или иных культурах клеток, антигенного разнообразия вирусов и доступности соответствующих антисывороток или моноклональных антител. Высокая чувствительность характерна для амплификационных методов, позволяющих выявлять вирус и давать ему генетическую характеристику, имея в реакционной смеси единичные молекулы вирусного генома. Уникальность последовательностей вирусных геномов и высокая избирательность метода ПЦР-РВ приближают его специфичность к 100%-му уровню. Секвенирование вирусных геномов позволяет проводить видовую и субвидовую таксономическую характеристику вирусов,

включая типирование, установление штаммовой принадлежности, выявление точечных мутаций [59].

Ограничением метода ПЦР является сложность его применения для диагностики на месте оказания медицинской помощи («point-of-care testing»), в походно-полевых условиях или в животноводческих хозяйствах. Высокая потребность в средствах диагностики «point-of-care» заставляет искать подходящие методы, в числе которых особый интерес представляют методы изотермической амплификации НК. Описано более десяти методов изотермической амплификации НК [60], из которых наиболее часто в практике лабораторной диагностики применяются методы транскрипционной амплификации РНК NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) [61–63], амплификации по типу катящегося кольца RCA (Rolling Circle Amplification), хеликазо-зависимой амплификации HDA (Helicase-Dependent Amplification) [64–67], петлевой изотермической амплификации ДНК LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) [60; 68; 69], амплификации с вытеснением цепи SDA (Strand Displacement Amplification) [70].

Важнейшим этапом развития вирусологии стало конструирование в 1981 году в двух лабораториях США инфекционного клона полиовируса и определение его полной геномной последовательности, что впервые было сделано для вирусов позвоночных. Инфекционный клон был создан Винсентом Раканьелло и Дэвидом Балтимором (Racaniello V., Baltimore D.) из Массачусетского технологического института, а секвенирование было проведено этой же группой, а также независимой группой Эккарда Виммера (Wimmer E.) из Государственного университета Нью-Йорка [71; 72]. Разработки В. Раканьелло, Д. Балтимора и Э. Виммера заложили основы методов обратной генетики и конструирования рекомбинантных вирусов, относящихся к разным семействам [73]. Кроме того, эти методы и подходы стали применяться при разработке вакцин, поскольку позволяют целенаправленно модифицировать вирусный геном и создавать аттенуированные вакцинные штаммы с желаемыми свойствами [73; 74]. Полиовирусы, как и другие представители семейства *Picornaviridae*, отличаются тем, что их РНК-геном, относительно небольшой по размеру (от 7 до 9 тыс. н.), имеет позитивную полярность и является инфекционным для чувствительных клеток в отсутствие вирусных белков. Эти свойства позволяют клонировать полный геном вируса в плазмидном векторе и получать в реакции транскрипции *in vitro* полную инфекционную копию вирусного генома. Альтернативным вариантом воспроизведения инфекционного процесса является встраивание геномной последовательности вируса под контроль эукариотического промотора и трансфекция чувствительной культуры клеток полученной рекомбинантной плазмидой (Рисунок 2).



Заражение чувствительной культуры клеток полиовирусом возможно путем: (1) инокуляции вирусом; (2) трансфекции нативной вирионной РНК, выделенной из вирусного материала; (3) трансфекции вирионной РНК, полученной в реакции транскрипции *in vitro*; (4) трансфекции ДНК-вектором, содержащим под контролем эукариотического промотора клонированный геном полиовируса.

Рисунок 2 - Способы заражения полиовирусом чувствительной культуры клеток (адаптировано по: Racaniello V.R. и др., 1981 [72])

Разнообразие вирусных геномов по типу и структуре НК (РНК или ДНК, одноцепочечная или двуцепочечная, одноцепочечная позитивной или негативной полярности, сегментированный или несегментированный геном и т.д.) и различия в стратегии геномов требует специфических подходов к получению молекулярных клонов для вирусов, относящихся к разным таксономическим группам. Геном ряда вирусов с РНК-геномом позитивной полярности (например, полиовирусы, флавивирусы, тогавирусы) и ДНК-содержащих вирусов (например, парвовирусы), является инфекционным для чувствительных клеток, что упрощает получение инфекционного клона вируса и генно-инженерные манипуляции с ним. Лимитирующим фактором является большой размер генома таких вирусов с РНК-геномом позитивной полярности, как коронавирусы (~30000 н.), что не позволяет клонировать их полный геном в едином плазмидном векторе. Однако для решения этой проблемы успешно используются более «ёмкие» альтернативные векторы (бактериофаги, искусственные бактериальные хромосомы) [73; 75]. Получение молекулярных клонов для РНК-



содержащих вирусов с геномом негативной полярности является технически более сложной задачей. Так, для разработки методов обратной генетики для вирусов с РНК-геномом негативной полярности, таких как вирусы кори, эпидемического паротита (семейство *Paramyxoviridae*), респираторно-синцитиальный вирус (семейство *Pneumoviridae*), или РНК-вирусов с сегментированным геномом - ротавирусов (11 генных сегментов двуцепочечной РНК, семейство *Rotoviridae*), вирусы гриппа (8 генных сегментов одноцепочечной РНК негативной полярности, семейство *Orthomyxoviridae*) потребовались многолетние усилия ведущих вирусологических лабораторий [75].

Начиная с 1980 г., для конструирования иммунобиологических препаратов начали использовать методы генетической инженерии, секвенирования ДНК, методы обратной генетики и технологии на основе рекомбинантных белков, продуцируемых в гетерологичных системах экспрессии. Последние два десятилетия ознаменовались разработкой вакцин нового поколения, которые дополнили арсенал средств специфической профилактики вирусных заболеваний, до этого представленный исключительно живыми аттенуированными и инактивированными вакцинами. В клиническую практику внедрены новые вакцины, основанные на рекомбинантных вирусных белках (вакцина против гепатита В) [76], вирусоподобных частицах (папилломавирусная вакцина) [77], вирусных векторах (вакцина против Эбола и COVID-19) [78; 79], мРНК-вакцины (вакцина против COVID-19) [80; 81]. Разработаны и внедрены в клиническую практику первые противовирусные рекомбинантные моноклональные антитела [82]. Современные технологические платформы позволяют разрабатывать вакцины, обладающие улучшенным профилем безопасности по сравнению с вакцинами на основе реплицирующихся вирусов. Напротив, преимущество живых аттенуированных вакцин (ЖАВ) и вакцин на основе репликационно-компетентных вирусных векторов заключается в высокой иммуногенности, более низких затратах на производство. Вместе с тем, ЖАВ, полученные традиционными методами, обладают потенциалом реверсии вирулентности и их применение противопоказано для лиц с ослабленным иммунитетом [73]. Методы обратной генетики позволяют целенаправленно изменять геном вакцинных штаммов, сводя риск реверсии вирулентности к минимуму [83; 84].

Важной тенденцией в развитии методов эпидемиологического мониторинга вирусных инфекций в конце XX – начале XXI века является постепенная замена культуральных, серологических и иммунохимических методов субвидовой характеристики вируса на молекулярно-биологические [9]. Это напрямую связано с наличием большого количества клинически значимых вирусов, не поддающихся или с трудом поддающихся культивированию (риновирусы С, ротавирусы, норовирусы, вирус гепатита С, папилломавирусы и др.) – в этих условиях молекулярные методы становятся незаменимыми. С другой стороны, ограничением

для иммунохимических методов является широкое антигенное разнообразие ряда вирусов человека, таких как риновирусы - виды *Enterovirus alpharhino*, *Enterovirus betarhino*, *Enterovirus cerhino* (более 160 типов), энтеровирусы - виды *Enterovirus alphacoxsackie*, *Enterovirus betacoxsackie*, *Enterovirus coxsackiepol*, *Enterovirus coxsackiepol* (более 80 типов), аденовирусы - виды *Mastadenovirus adami*, *Mastadenovirus faecale* и *Mastadenovirus russelli* (более 70 типов), папилломавирусы – (49 видов, не менее 231 генотипа) [85]. В то же время, универсальность, высокая чувствительность и специфичность молекулярных методов, возможность субвидовой и штаммовой идентификации возбудителя, появление новых производительных и высокоинформативных методов (мультиплексная ПЦР-РВ, методы секвенирования 2-го и 3-го поколения) обеспечили им неоспоримые преимущества перед традиционными методами. Пандемия COVID-19 позволила в полной мере раскрыть потенциал новейших методов генетической характеристики вирусов, когда основным подходом к субвидовой характеристике SARS-CoV-2 стало полногеномное секвенирование. В следующем разделе будут описаны основные современные подходы к субвидовой характеристике ротавирусов, папилломавирусов и SARS-CoV-2.

### 1.1.3 Генотипирование папилломавирусов человека

Папилломавирусы человека – это безоболочечные ДНК-содержащие вирусы, относящиеся к семейству *Papillomaviridae*. Геном папилломавирусов, представленный кольцевой двуцепочечной ДНК размером примерно 8000 п.н. кодирует 9 структурных и неструктурных вирусных белков, из которых антигенные свойства, иммуногенность и генотип вируса определяет капсидный белок L1 (Рисунок 3). Поскольку папилломавирусы не поддаются культивированию и их серотипирование в классической реакции нейтрализации невозможно, классификация папилломавирусов основана на изучении степени сходства геномных нуклеотидных последовательностей [86]. По данным международного референс-центра по ВПЧ на 2023 год известен 231 генотип ВПЧ [87], относящихся к 49 видам и 5 родам (*Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gamma papillomavirus*, *Mupapillomavirus*, *Nurapillomavirus*), тогда как реальное разнообразие ВПЧ может достигать 400 типов [88].

Среди типов ВПЧ наибольшей клинической значимостью характеризуются представители рода *Alphapapillomavirus*. Имеются убедительные доказательства канцерогенности для человека 13 типов ВПЧ, отнесенных к ВПЧ высокого онкогенного риска (ВПЧ-ВР), принадлежащих к видам *Alphapapillomavirus 5* (ВПЧ51), *Alphapapillomavirus 6* (ВПЧ56), *Alphapapillomavirus 7* (ВПЧ18, 39, 45, 59, 68) и *Alphapapillomavirus 9* (ВПЧ16, 31, 33, 35, 52, 58) [89]. На 13 наиболее распространенных типов ВПЧ-ВР приходится 96% случаев рака шейки матки (РШМ) [90]. Кроме того, по крайней мере семь других филогенетически родственных типов (ВПЧ26, 53, 66,

67, 70, 73, 82) в редких случаях были ассоциированы с РШМ в виде моноинфекции ВПЧ и относятся к потенциально канцерогенным типам [90]. К роду *Alphapapillomavirus* относятся также ВПЧ низкого онкогенного риска (ВПЧ-НР), которые вызывают появление доброкачественных генитальных кондилом - ВПЧ6, 11, 13, 44 (вид *Alphapapillomavirus 10*) [86]. В целом ДНК ВПЧ при генитальных кондиломах и папилломах гортани выявляется в 95% случаев, причем наиболее частыми типами являются ВПЧ6 и ВПЧ11 [91].



Неструктурные белки кодируются ранней, а структурные белки - поздней областью генома. URR - предшествующая регуляторная область. P<sub>E</sub> и P<sub>L</sub> обозначают ранние и поздние промоторы, а P<sub>AE</sub> и P<sub>AL</sub> обозначают сайты раннего и позднего полиаденилирования.

Рисунок 3 - Структура генома папилломавирусов на примере ВПЧ16 (адаптировано по: Yu L. и др., 2022 [92])

ВПЧ-инфекция является серьезной медицинской проблемой. ВПЧ инфицирует клетки базального слоя эпителия, что приводит к их неконтролируемому размножению, последствием чего может быть появление папиллом, остроконечных кондилом, а также возникновение злокачественных опухолей различной локализации [93; 94]. В мире ежегодно регистрируется более 630 тысяч новых случаев онкологических заболеваний, вызванных ВПЧ, что составляет 4,5% всех случаев рака (8,6% у женщин и 0,8% у мужчин) [95; 96]. В довакцинальном периоде ежегодно у 530 тысяч женщин диагностировали РШМ, из них 270 тысяч погибали, что подчеркивает острую необходимость массовой вакцинопрофилактики ВПЧ-инфекции [95]. ВПЧ также является основной причиной вагинальных и анальных злокачественных новообразований (70-90%), а также значительной доли рака полового члена (35-50%), рака

вульвы и ротоглотки (30-40%) [95–98]. Экономический ущерб, наносимый этой инфекцией, огромен - в России финансовое бремя ВПЧ-ассоциированных заболеваний оценивается в 63 млрд рублей в год [99].

По предварительным оценкам вакцинация против ВПЧ в возрасте от 9 до 12 лет предотвращает более 90% предраковых заболеваний шейки матки, при этом у людей в возрасте от 21 до 65 лет РШМ можно предотвратить путем скрининга и лечения предраковых заболеваний шейки матки [100]. Отсутствие лечения приводит к прогрессированию РШМ. Цервиковагинальное тестирование на ВПЧ с 90%-й точностью позволяет предсказать развитие предраковых заболеваний. У людей с положительным результатом теста на ВПЧ комбинация генотипирования ВПЧ и цитологического исследования шейки матки по Папаниколау позволяет оценить риск развития предракового состояния [100].

Для специфической профилактики папилломавирусных заболеваний разработаны вакцины, специфическую активность которых определяют вирусоподобные частицы на основе рекомбинантного капсидного белка L1, получаемого в системах гетерологичной экспрессии в клетках дрожжей, насекомых или бактерий [101–103]. Лицензированные ВПЧ-вакцины включают разное количество типов ВПЧ – от 2 до 9. Так, вакцины Cervarix (GlaxoSmithKline, Бельгия), Cecolin (Xiamen Innovax Biotech Co. КНР) и Walrinvax® (Yuxi Zerun Biotechnology Co., КНР) включают ВПЧ16 и 18. Вакцины Gardasil (Merck & Co., США), CervaVac (Serum Institute of India, Индия) включают ВПЧ6, 11, 16, и 18, а в состав Gardasil9 (Merck & Co., США) входят ВПЧ6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 и 58 [104]. Вакцинопрофилактика наиболее эффективна в борьбе с папилломавирусными заболеваниями при вакцинации в молодом возрасте – для подростков в возрасте 9-14 лет эффективность вакцинации варьирует по данным разных исследований от 74% до 93%, а для подростков в возрасте 15-18 лет - от 12% до 90%. [105]. Достигнутый успех массового применения папилломавирусных вакцин позволяет рассматривать ВПЧ-инфекцию как вакциноуправляемую.

Существующие системы генотипирования, как правило, направлены на дифференциальное выявление перечисленных выше клинически наиболее значимых типов ВПЧ. Генотипирование выявленных у пациентов штаммов ВПЧ позволяет оценить риск развития дисплазии эпителия пораженных вирусом тканей и прогнозировать развитие заболевания. По данным на 2022 год 122 страны из числа членов ВОЗ ввели ВПЧ-вакцину в НКИ. В России ВПЧ-вакцина пока не входит в НКИ, поэтому исследование генетического разнообразия ВПЧ, циркулирующих в стране, актуально еще и с точки зрения прогнозирования эффективности существующих вакцин с учетом их состава, а также при разработке новых ВПЧ-вакцин. Важной тенденцией в этом направлении является увеличение количества компонентов в составе новых вакцин – от двух типов (ВПЧ-16 и ВПЧ-18) в составе вакцин Cervarix

(GlaxoSmithKline Biologicals, Бельгия), Cecolin (Xiamen Innovax Biotech, Китай) и Walrinvax (Walvax Biotechnology, Китай) до 9 типов в вакцине Gardasil9 (Merck & Co, США) [101–103].

Базовым методом генотипирования ВПЧ является типоспецифическая ПЦР, направленная на дифференциальное выявление клинически значимых типов ВПЧ. Расширение знаний об онкогенном потенциале ВПЧ и списка онкогенных типов ВПЧ сопровождалось увеличением перечня анализируемых типов. Наборы реагентов для генотипирования ВПЧ первого поколения и ранние исследования по оценке распространенности ВПЧ разных типов, как правило, были ограничены малым количеством дифференцируемых типов ВПЧ (от 2 до 12 типов) [106]. Современные коммерческие наборы реагентов на основе ПЦР предоставляют возможность выбора более или менее широких линеек анализируемых типов ВПЧ – от двух (например, ВПЧ16, 18, или ВПЧ6, 11) до 28 типов. В качестве примера ниже перечислены современные наборы реагентов для генотипирования ВПЧ, получившие широкое применение в медицинской и эпидемиологической практике.

Cobas 4800 HPV test («Roche», Швейцария) - набор реагентов для генотипирования ВПЧ 16 и ВПЧ 18, а также выявления в общем пуле других типов ВПЧ-ВР (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68) в случае их присутствия в клинически значимой концентрации [107–109].

Seeplex HPV4A ACE («Seegene», Южная Корея) - набор реагентов для генотипирования ВПЧ 16 и 18, а также для скринингового выявления в общем пуле 16 типов ВПЧ ВР 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, и 82 и двух типов ВПЧ-НР 6 и 11 [110].

Anyplex™ II HPV28 и Allplex™ HPV28 Detection («Seegene», Южная Корея) наборы реагентов, основанные на мультиплексной ПЦР-РВ, для генотипирования 19 типов ВПЧ-ВР (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82) и 9 типов ВПЧ-НР (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70) – всего 28 генотипов [107; 109].

АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-14-FL («Интерлабсервис», Россия) - набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК 14 типов ВПЧ ВР 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68-го генотипов и отдельного определения ДНК ВПЧ 16, 18 и 45-го генотипов в биологическом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией [111].

HPV квант-21 («ДНК-Технология», Россия) - набор реагентов для выявления, типирования и количественного определения ДНК вируса папилломы человека низкого (HPV 6, 11, 44) и высокого (HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) канцерогенного риска [112–114]

В ряде исследований для генотипирования ВПЧ применяются лабораторные тест-системы на основе NGS [115–119]. В большинстве упомянутых работ для подготовки библиотеки использовали вирусоспецифичные праймеры для амплификации участка гена L1 ВПЧ, после

чего во втором раунде ПЦР к ампликону присоединяли баркоды и адаптеры. Далее на одной из платформ NGS проводили высокопроизводительное секвенирование. Для установления генотипа полученные прочтения сравнивали с референсными последовательностями. Такой подход позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью идентифицировать генотипы ВПЧ, что подтверждается применением в качестве золотого стандарта ПЦР-систем генотипирования либо синтетических фрагментов генома ВПЧ разных типов. Авторы работ рассматривают генотипирование ВПЧ методами NGS как экономически эффективный подход к масштабному генотипированию ВПЧ из клинических образцов.

Технология нанопорового секвенирования также нашла применение в генотипировании ВПЧ. Некоторые исследователи в процессе подготовки вирусного генома для НПС применяли вирусоспецифичную амплификацию гена L1 [120], другие ставили целью получение полногеномной последовательности [121; 122]. Генотипирование методом НПС с вирусоспецифичной амплификацией гена L1 представляет собой экономичный протокол, стоимость которого Chan W.S. с соавт. оценили примерно в 50 долларов США за один образец при условии 24-кратного мультиплексирования [120]. При этом НПС позволило выявить несколько генотипов ВПЧ, не выявленных референсным методом [120]. В работе Yang S. с соавт. методом НПС ДНК из образца раковой ткани шейки матки было получено 678 прочтений генома ВПЧ35, что обеспечило 97-кратное покрытие и 99,96%-ю идентичность с последовательностью, полученной секвенированием по Сэнгеру [122]. В этой же работе методом НПС был расшифрован геном ВПЧ16 из культуры клеток CaSki при 3857-кратном покрытии генома и с 99,99%-й точностью (по сравнению с известной референсной последовательностью - GenBank ID U89348) [122]. Brancaccio R.N. с соавт. показали, что использование нанопорового секвенатора MinION представляет собой эффективный подход к полногеномному секвенированию ВПЧ с минимальной частотой ошибок [121]. Авторы разработали два протокола, которые позволили получить сопоставимое количество прочтений - 9354933 и 3255879, и определить полную геномную последовательность вируса точностью в 100 % для протокола А и 99,98 % для протокола В.

#### **1.1.4 Подходы к генетической характеристике ротавирусов человека**

Патогенные для человека ротавирусы относятся к виду *Rotavirus alphagastroenteritidis* (ротавирусы группы А), семейство *Sedoreoviridae*. Ротавирусы группы А – основная причина госпитализации детей до 3 лет с симптомами острых кишечных инфекций (ОКИ) во всем мире. Ротавирусная инфекция является вакциноуправляемой. По состоянию на 2022 г. вакцинация против ротавирусного гастроэнтерита введена в НКИ в 111 странах мира. Существует четыре лицензированных вакцины, рекомендованные ВОЗ: пентавалентные – RotaTaq (G1, G2, G3, G4,

P[8], «Merck»), ROTASIL (G1, G2, G3, G4, G9, «Serum Institute of India»), и моновалентные - Rotarix (G1P[8], «GlaxoSmithKline»), ROTAVAC (G9P[11], «Bharat Biotech») [123]. Массовая вакцинопрофилактика существенно снижает заболеваемость и число госпитализаций, вызванных РВА. В связи с массовым применением ротавирусных вакцин возросла актуальность наблюдения за биоразнообразием циркулирующих штаммов РВА. В настоящее время в мире в структуре циркулирующих штаммов ротавирусов преобладают штаммы с генотипами G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] и G9P[8], гомотипичные или частично гетеротипичные по отношению к вакцинным штаммам [124]. Вместе с тем, в ряде регионов мира выявляются клинически значимые штаммы РВА, полностью гетеротипичные по отношению к вакцинам (например, G12P[6], G9P[4], G8P[6], G9P[6] и др.) [125; 126]. Несмотря на имеющиеся данные о перекрестной протективной активности ротавирусных вакцин, в том числе против полностью гетеротипичных штаммов [127; 128], крайне важно продолжать изучать антигенное разнообразие циркулирующих штаммов РВА. Нельзя полностью исключать вероятность селективного влияния вакцинопрофилактики на антигенный состав ротавирусной популяции, что может привести к появлению штаммов, «ускользающих» от поствакцинального иммунитета. В связи с этим необходимость эпидемиологического мониторинга ротавирусной инфекции не вызывает сомнений.

Ранее для выявления ротавирусов в фекальных образцах применялись ТЭМ, культуральный метод и электрофорез в полиакриламидном геле для выявления РНК-сегментов ротавирусного генома. В современной клинической и вирусологической практике применяется выявление ротавирусного антигена методом ИФА или в реакции иммунохроматографии и выявление ротавирусной РНК методом ОТ-ПЦР-РВ [129–131]. Общепринятая методика G/P серотипирования ротавируса была основана на использовании в ИФА типоспецифичных моноклональных антител [131]. Недостатком серотипирования является высокая доля нетипируемых образцов (до 30%) вследствие отсутствия полного набора моноклональных антител для всех существующих серотипов. В связи с этим субвидовая характеристика ротавирусов в настоящее время проводится исключительно молекулярными методами, которые отличаются высокой чувствительностью, специфичностью и позволяют быстро выявлять и генотипировать штаммы ротавируса.

Генотипирование ротавируса по генам VP4 (Р геновариант) и VP7 (G геновариант) реализуется путем анализа вирусной РНК, выделенной из фекальных образцов от пациентов с подтвержденной ротавирусной инфекцией, методом мультиплексной типоспецифической ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией результата [129; 131–133]. На сайте ВОЗ опубликовано руководство по генотипированию ротавирусов, согласно которому в реакции обратной транскрипции получают кДНК 4-го и 9-го генных сегментов, кодирующих белки VP4 (Р) или

VP7 (G) [134]. Далее на первом раунде ПЦР амплифицируется большой фрагмент вирусного генома, включающий вариабельные типоспецифичные участки. На втором раунде проводится мультиплексная ПЦР с типоспецифичными праймерами, комплементарными вариабельным участкам в гене VP4 (P[4], P[6], P[8], P[9], P[10] и P[11]) и в гене VP7 (G1, G2, G3, G4, G9 и G12), после чего путем прямой визуализации генотипоспецифичных ампликонов разного размера с помощью электрофореза в агарозном геле производится учет результата. Варианты гена G соответствуют по названию серотипу, тогда как варианты гена P не соответствуют по названию серотипу, поэтому P-генотип принято указывать в квадратных скобках.

Эволюция ротавирусов требует периодической корректировки наборов типоспецифичных праймеров. Кроме того, поскольку в типоспецифичной ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией высока вероятность получения ложноположительных результатов вследствие контаминации ампликонами, были разработаны системы генотипирования на основе ОТ-ПЦР с детекцией в режиме реального времени [135–139].

Современная система классификации ротавирусов предполагает генотипирование по всем 11 генам (Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx). Большинство циркулирующих штаммов РВА человека относятся к одной из трёх наиболее представленных констелляций генома: Wa-подобные штаммы (G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1), DS-1-подобные (G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) и AU-1-подобные штаммы (G3-P[3]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3) [140; 141]. Критерии для установления генотипа разработаны международной Рабочей группой по классификации ротавирусов (Rotavirus Classification Working Group, RCWG). Основным критерием отнесения к генотипу является степень сходства нуклеотидной последовательности соответствующего гена с референсной последовательностью штамма ротавируса с известным генотипом [141]. Для быстрого определения генотипа по известной нуклеотидной последовательности на основе рекомендаций RCWG разработана специальная онлайн-программа [142]. Для определения констелляции генома требуется полное секвенирование ротавирусного генома [129]. С развитием методов секвенирования второго поколения полногеномное генотипирование ротавирусов становится более доступным и осуществляется с применением разных технологических платформ - Roche 454 («Roche Diagnostic», США), Ion Torrent («Life Technologies», США), Illumina HiSeq или Illumina MiSeq («Illumina», США).

Для большинства NGS-платформ для секвенирования требуется высокоочищенная двуцепочечная ДНК. Следовательно, для секвенирования геномов бактерий, грибов, ДНК-содержащих вирусов можно напрямую использовать ДНК, выделенную из биологических образцов. Однако, подготовка для секвенирования генома РНК-содержащих вирусов, в особенности ротавирусов, имеющих сегментированный РНК-геном, требует разработки



специфических подходов, включая получение вирусной кДНК в реакции обратной транскрипции.

При полногеномном секвенировании ротавирусов возможно применение двух подходов к пробоподготовке - метагеномного и вирусоспецифичного. Метагеномный подход подразумевает выявление в клиническом образце всех геномных последовательностей, включая вирусные (виром), что обеспечивается специальной пробоподготовкой с последующим применением методов высокопроизводительного секвенирования [143]. Метагеномный подход реализован в работе Simsek С. с соавт., которые исследовали циркуляцию ротавирусов в Бельгии, выявив в образцах детей с ОГЭ штаммы ротавирусов вакцинного происхождения [144]. Пробоподготовка в данной работе заключалась в получении гомогената фекалий, удаления клеток человека и бактерий центрифугированием и пропусканием супернатанта через фильтр с диаметром пор 0,8 мкм, обработкой фильтрата высокоэффективными нуклеазами - бензоназой и микрококковой нуклеазой для разрушения всех вневирусных НК, выделении вирусной НК. Обратную транскрипцию со «случайными» праймерами и синтез второй цепи ДНК проводили по протоколу Whole Transcriptome Amplification (WTA2) [143]. Далее создавали библиотеку ДНК с использованием набора реагентов Nextera XT («Illumina») и секвенировали на платформе Illumina NextSeq 500. Метагеномный подход к генетической характеристике ротавирусов и других кишечных вирусов, присутствующих в клинических образцах, применен в ряде других исследований [145–149].

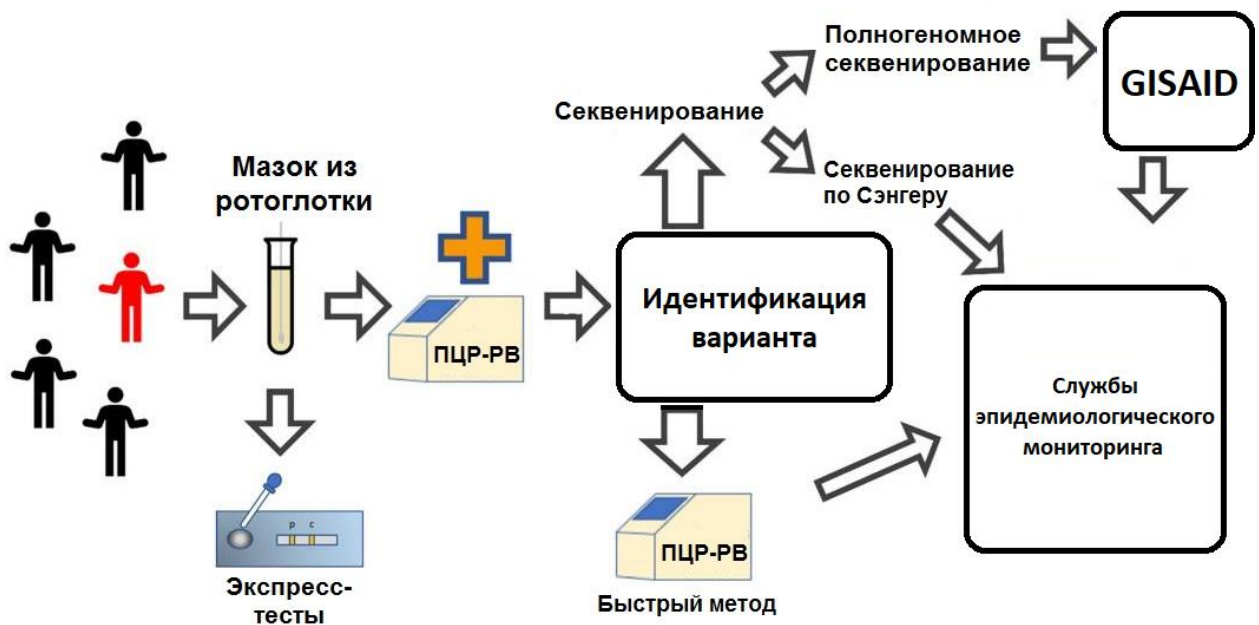
Технология НПС (секвенирование третьего поколения) открыла широкие возможности для совершенствования методов эпидемиологического мониторинга вирусных инфекций. Портативное оборудование, быстрая пробоподготовка, возможность получения длинных прочтений, высокая производительность – это характеристики, позволяющие рассматривать технологию НПС как наиболее перспективную для эпидемиологического мониторинга вирусных инфекций. В ряде пионерских работ описано успешное применение НПС для генетической характеристики ротавирусов с применением как метагеномного [150; 151], так и вирусоспецифического подхода [152].

### **1.1.5 Методические подходы к генетической характеристике SARS-CoV-2**

Коронавирус SARS-CoV-2 относится к виду *Betacoronavirus pandemicum*, семейство *Coronaviridae*. Геном SARS-CoV-2 представлен одноцепочечной РНК позитивной полярности размером около 30000 н. Пандемическое распространение SARS-CoV-2 в период с декабря 2019 года по настоящее время сопровождается появлением новых эпидемически значимых вариантов вируса, обладающих повышенной контагиозностью. В недавнем исследовании, проведенном в США, было показано, что частота нуклеотидных мутаций во всем геноме SARS-

CoV-2 составила  $6,677 \cdot 10^{-4}$  замен на сайт в год, тогда как в S-гене этот показатель составил  $8,066 \cdot 10^{-4}$  замен на сайт в год, что среднем соответствовало уровню изменчивости других РНК-вирусов [153]. Однако, согласно последним исследованиям, скорость эволюции нового коронавируса постепенно снижается [154]. Это, вероятно, связано с наличием у коронавируса механизма репарации генома, исправляющего ошибки, возникающие во время матричного синтеза вирусной РНК, что несколько ограничивает изменчивость SARS-CoV-2 [155].

Впервые за всю историю во время пандемии SARS-CoV-2 эпидемиологический мониторинг распространения вируса осуществлялся практически в режиме реального времени путем филогенетического анализа полноразмерных последовательностей вирусного генома. Движение исследуемых клинических образцов при эпидемиологическом мониторинге SARS-CoV-2 схематично представлено на Рисунке 4.



Образцы от пациентов с симптомами ОРВИ сначала анализируют на РНК SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР-РВ, либо в иммунохроматографическом экспресс-тесте. Вирусодержащие по результатам ОТ-ПЦР-РВ образцы вирусной РНК с приемлемой вирусной нагрузкой (значение ПЦ не более 33) используются для дальнейшего секвенирования методами Сэнгера, NGS или в реакции вариант-специфической ОТ-ПЦР-РВ. Результаты идентификации геноварианта SARS-CoV-2 затем отправляются в службы эпидемиологического мониторинга.

Рисунок 4 - Схема исследования образцов при эпидемиологическом мониторинге SARS-CoV-2 (адаптировано по: Verno G. и др., 2022 [154])

Уже 10 января 2020 года первые полногеномные последовательности SARS-CoV-2 стали доступны в базе данных GISAID (Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data, Глобальная инициатива по обмену данными о птичьем гриппе) [156], использовавшейся до начала пандемии COVID-19 преимущественно для обмена последовательностями генома вирусов

гриппа [157]. С тех пор около 20 миллионов полногеномных последовательностей SARS-CoV-2 были депонированы в GISAID, которая стала крупнейшей в мире коллекцией геномов SARS-CoV-2 [158]. Только страны Европы депонировали в GISAID более 5 миллионов последовательностей. Кооперативное накопление и использование полногеномных последовательностей вирусного генома позволило быстро в глобальном масштабе принять ответные меры на пандемию, включая разработку диагностических тест-систем, профилактических вакцин и противовирусных лекарственных препаратов [154; 159]. Так, доступность геномных последовательностей вируса позволила в сжатые сроки разработать методические подходы к его генетической характеристике, вирусоспецифические протоколы полногеномного секвенирования на основе SARS-CoV-2 и тест-системы для быстрого обнаружения SARS-CoV-2.

Полногеномная характеристика SARS-CoV-2 актуальна для эпидемиологического мониторинга и выявления новых геновариантов вируса, при отслеживании контактов и расследовании вспышек, при анализе причин низкой эффективности иммунизации, расследовании случаев реинфекции [159]. Более того, полногеномная характеристика SARS-CoV-2 позволяет даже прогнозировать эффективность нейтрализующих моноклональных антител [160]. Секвенирование полного генома SARS-CoV-2 с использованием технологий секвенирования нового поколения (NGS) стала золотым стандартом в мониторинге и идентификации новых вариантов вируса [159]. Методические рекомендации по отбору проб и секвенированию генома SARS-CoV-2 представлены в руководстве Европейского центра по контролю и профилактике заболеваний (European Centre for Disease Prevention and Control) и ВОЗ [161]. NGS позволяет секвенировать все гены SARS-CoV-2, в том числе кодирующие неструктурные белки и внутригенные участки. Анализ имеющихся геномов позволил быстро идентифицировать наиболее консервативные участки вируса, что являлось важнейшим условием для быстрой разработки диагностических тест-систем. Филогенетические исследования, проводимые на основе анализа полных геномов, дают более точные результаты по сравнению с исследованиями, проведенными на основе последовательностей отдельных генов. Именно полногеномный мониторинг мутационных изменений среди циркулирующих штаммов позволяет своевременно выявить появление новых эпидемически значимых вариантов [154].

Методы NGS позволяют выявлять минорные варианты вирусов (варианты, содержащие мутации с частотой <50%), что может применяться для мониторинга «ускользающих» вариантов вируса у пациентов с иммуносупрессией или у пациентов, получающих моноклональные антитела [162–166].

Для полногеномного секвенирования генома SARS-CoV-2 можно использовать два подхода: вирусоспецифический (на основе ПЦР-ампликонов, перекрывающих весь геном вируса) и метагеномный (секвенирование всех НК в клиническом образце). В самом начале пандемии COVID-19 геном вируса, вызвавшего пневмонию у китайских пациентов г. Ухане, был расшифрован именно с помощью метагеномного подхода [167]. Метагеномный анализ позволяет получить полную геномную последовательность SARS-CoV-2, не имея информации о таксономической принадлежности возбудителя заболевания. Благодаря молекулярным методам потенциал обнаружения новых вирусов был увеличен с помощью предварительной пробоподготовки, направленной на снижение содержания в образце невирусных НК. Так, предварительная обработка ДНКазой I с последующей фильтрацией, примененная ранее Allander T. с соавт. для обнаружения и генетической характеристики бокавирусов человека [45], увеличила долю прочтений генома SARS-CoV-2 при NGS-секвенировании более чем в 500 раз [168]. Этого было достаточно для обнаружения вируса и идентификации его геноварианта. Первые два завозных случая COVID-19 в Италии (январь 2020 г.) также были охарактеризованы с использованием метагеномного подхода по протоколу SISPA (Sequence Independent Single Primer Amplification) [169] на платформе прибора Ion Torrent («Thermo Fisher Scientific»), что позволило получить 40 миллионов прочтений вирусного генома на образец [170].

На основе анализа вирусных геномов впоследствии были разработаны наборы праймеров для ПЦР-амплификации всего генома SARS-CoV-2 с получением ряда перекрывающихся ампликонов (вирусоспецифичный подход). Основное преимущество этого подхода - меньшая стоимость анализа одного образца благодаря возможности повышения степени мультиплексности, что делает его более эффективным и менее трудоемким. Для разных платформ секвенирования, в первую очередь для секвенаторов Ion Torrent, Illumina и Oxford Nanopore Technologies были разработаны различные протоколы специфической амплификации вирусного генома [154].

Один из наиболее часто используемых наборов праймеров для полногеномной амплификации SARS-CoV-2 (около 200 олигонуклеотидов) был разработан рабочей группой ARTIC Network [171] еще в марте 2020 года. Первая версия праймеров ARTIC была основана на эталонной последовательности генома Wuhan-01 (GenBank ID MN908947). Эволюция вируса потребовала корректировки этого набора праймеров, и на сегодняшний день известно несколько разных версий наборов праймеров ARTIC [172]. Наиболее часто вирусоспецифичная пробоподготовка для секвенирования генома SARS-CoV-2 применяется при реализации технологии Illumina; на втором месте технология нанопорового секвенирования, с применением которой определено примерно 25% известных последовательностей. Более

широкое применение технологии Illumina определяется тем, что в сравнении с технологией НПС она обеспечивает лучшее покрытие генома, допускает меньше ошибок, а также тем, что многие лаборатории мира оснащены приборами Illumina [173].

Альтернативная панель праймеров, разработанная в 2020 году компанией Life Technologies, известна под названием «SARS-CoV-2 Insight Research Assay Panel» и предназначена для секвенирования приборе Ion Torrent. Обновленная версия протокола называется «SARS-CoV-2 Insight Research Assay Panel» [174]. По данным Plitnick J. с соавт. данная панель праймеров на приборе Ion Torrent обеспечивает сопоставимое покрытие генома по сравнению с ARTIC на основе прибора MiSeq («Illumina») [175].

Технологии NGS позволяют получить большой массив прочтений, дальнейший анализ которых требует специфической обработки биоинформатическими методами. Ряд лабораторий пользуются программами для обработки данных собственной разработки, которые для широкого применения неудобны. На сегодняшний день для решения задач обработки исходных («сырых») данных секвенирования и оценки качества секвенирования предложен ряд программных инструментов, причем выбор программного продукта определяется как используемой технологией секвенирования, так и предпочтениями пользователя [176–180].

Среди востребованных инструментов для анализа исходных данных секвенирования и сборки вирусных геномов есть программа IRMA (Iterative Refinement Meta-Assembler) [179], разработанная в Центре по контролю и профилактике заболеваний (CDC, США) для анализа высоковариабельных РНК-вирусов. Для анализа данных, получаемых на платформе Illumina, рекомендована программа DRAGEN (Dynamic Read Analysis for GENomics) [177], тогда как для «бейсколлинга» (распознавание нуклеотидов по исходному сигналу) данных, получаемых в технологии НПС, рекомендуется программа Guppy [176].

Существует также ряд алгоритмов и программ для быстрой идентификации геновариантов SARS-CoV-2. В большинстве этих инструментов субвидовая таксономическая принадлежность устанавливается на основе одного из двух алгоритмов: Nextclade или Pangolin, разработанных рабочими группами Nextstrain и Pango [181; 182]. На сайте рабочей группы Nextstrain отмечается, что Nextclade - это инструмент, который выполняет выравнивание геномных последовательностей, распознает мутации, устанавливает филогенетические связи, осуществляет проверку качества получаемых последовательностей для вирусов гриппа, оспы обезьян, SARS-CoV-2, респираторно-синцитиального вируса и ряда других патогенов [183]. Номенклатура и веб-сайт Pango включает набор специализированных программ только для анализа последовательностей SARS-CoV-2, включая варианты повышенной эпидемиологической значимости [184].

В ряде случаев новые мутации могут появляться в сайте связывания праймера для специфической амплификации, что снижает выход ампликона и затрудняет полную автоматизацию анализа. В этих случаях для правильной интерпретации результатов очень важен опыт биоинформатика, осуществляющего анализ прочтений, что особенно важно для безошибочной идентификации вновь возникающих вариантов. В этих случаях секвенирование S-гена по Сэнгеру является надежным и доступным способом характеристики новых вариантов. Один из возможных протоколов секвенирования S-гена методом Сэнгера с использованием набора праймеров, нацеленных на S-ген, включая фланкирующие его участки, описан в работе Salles T. с соавт. [185].

Представляют интерес также тест-системы для быстрой идентификации геновариантов SARS-CoV-2, основанные на реакции ОТ-ПЦР-РВ, как моноспецифической, так и мультиплексной. Амплификационные тесты не обладают такой разрешающей способностью, как полногеномное секвенирование, но позволяют быстро идентифицировать новые эпидемически значимые варианты вируса. Важно отметить, что вследствие постоянного процесса появления и распространения новых геновариантов вируса, что сопровождается прекращением циркуляции более ранних геновариантов, ранние тест-системы идентификации геновариантов уже утратили свою актуальность. В связи с этим, рассматривать их подробно не представляется целесообразным. В обзорной статье Verno G. с соавт. рассмотрен ряд коммерчески доступных и лабораторных методик скрининга и идентификации вариантов SARS-CoV-2 [154].

## **1.2 Биологическое разнообразие и эволюция SARS-CoV-2 в условиях пандемического распространения**

После появления первых случаев заражения в китайском Ухане в декабре 2019 года, новая коронавирусная инфекция COVID-19, вызванная SARS-CoV-2, распространилась во всех странах земного шара и стала первой в истории зарегистрированной пандемией, вызванной коронавирусом [186]. По данным университета Джона Хопкинса (Johns Hopkins Coronavirus Resource Center, США), по состоянию на начало 2023 года COVID-19 был диагностирован у более чем 670 млн человек по всему миру и стал причиной более 6,8 млн смертей [187].

Быстрое и широкое распространение нового коронавируса определила его дивергенцию - появление штаммов, отличающихся по биологическим свойствам, наиболее значимыми из которых являются патогенность, вирулентность и контагиозность. Под *патогенностью* вируса понимается его способность вызывать заболевание. Термин «вирулентность» в зависимости от контекста может иметь различные значения. В настоящем обзоре под *вирулентностью* вируса подразумевается мера его патогенности, то есть способность вируса вызывать более или менее

тяжёлые заболевания, при этом степень вирулентности определяется коэффициентом летальности. *Контагиозность* (трансмиссивность) вируса - это его способность передаваться от больных организмов здоровым. Мерой контагиозности являются взаимосвязанные показатели: индекс контагиозности (доля лиц из числа восприимчивых, которые заболели после контакта с источником возбудителя) и базовое репродуктивное число  $R_0$  (среднее количество лиц, напрямую инфицированных больным в течение всего заразного периода при условии попадания его в полностью восприимчивую популяцию) [188].

Одной из актуальных задач фундаментальной и медицинской вирусологии является определение природы патогенности и вирулентности вирусов, в том числе вирусов животного происхождения. Несмотря на прогресс, достигнутый в понимании эволюции вирусов, вопрос об изменении вирулентности вирусов, возникших в результате межвидовой передачи, остается дискуссионным. Становится ли вирус более или менее вирулентным в новом хозяине? Каким образом уровень вирулентности модулируется под влиянием естественного отбора? Существуют ли закономерности эволюции вирулентности вирусов в новом хозяине, позволяющие прогнозировать направление этого процесса? Упрощенная интерпретация эволюции вирулентности заключается в том, что естественный отбор будет оптимизировать уровень вирулентности таким образом, чтобы повышалась эффективность передачи вируса, характеризующаяся базовым репродуктивным числом ( $R_0$ ) [189]. Адаптация вируса к новому хозяину формируется сложным набором взаимодействий факторов хозяина и возбудителя. Согласно современным представлениям, при межвидовой передаче первоначальная вирулентность вируса может варьироваться от отсутствия патогенности (бессимптомное носительство) до высокой патогенности, причем прогнозировать направление изменения вирулентности крайне сложно. Встреча человечества с высоковирулентным пандемическим вирусом животного происхождения происходит не очень часто - один раз в несколько десятилетий. При условии высокой контагиозности вируса и отсутствии популяционного иммунитета последствия этого могут быть тяжелейшими и иметь глобальное значение. В связи с этим, крайне важно понимать и прогнозировать эволюцию биологических свойств SARS-CoV-2 [188].

При глобальном распространении SARS-CoV-2 с отчетливым порогом начала пандемии новой для иммунной системы человека вирусной инфекции возникли условия, когда возможно получить достаточно убедительные данные о том, зависит ли структура клинических форм COVID-19 от динамических изменений генетически обусловленных биологических свойств вируса, или же она детерминируется только характеристиками хозяина? Этот малоизученный вопрос является принципиальным для разработки вакцин и планирования ресурсов общественного здравоохранения различных стран [188].

### **Общая характеристика SARS-CoV-2**

Пандемический SARS-CoV-2, наряду с SARS-CoV-1, относится к виду *Betacoronavirus pandemicum* (первоначальное название вида - *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*), подроду *Sarbecovirus*, роду *Betacoronavirus*, подсемейству *Orthocoronavirinae*, семейству *Coronaviridae*, отряду *Nidovirales* [1]. Следует отметить, что вместе с перечисленными патогенами, к подроду *Sarbecovirus* также относятся коронавирусы, выделенные у летучих мышей, в частности, у подковоносов (род *Rhinolophus*) [190]. Было установлено, что последовательность генома SARS-CoV-2 на 96,2% и 93,3% совпадает с геномом коронавирусов летучих мышей RaTG13 и RmYN02, соответственно [191; 192]. Степень сходства нуклеотидных последовательностей и эволюционный анализ лежат в основе гипотезы о том, что именно летучие мыши являются природным резервуаром SARS-CoV-2, который через неизвестных промежуточных хозяев попал в человеческую популяцию [193; 194]. Кроме того, было установлено, что сходство с геномом коронавирусов, выделенных у панголинов, составляет 85,5-92,4% [195], с геномом SARS-CoV-1 - 80% [192], а с геномом MERS-CoV, принадлежащего к подроду *Merbecovirus* - 50% [196]. Однако степень гомологии генома сильно варьирует в зависимости от генов, а также геномных локусов [190], при этом основные различия между этими вирусами наблюдаются в последовательности ORF1a и гена, кодирующего шиповидный белок S, который играет ключевую роль при взаимодействии вируса с клеткой [197]. Эти особенности организации генома могут быть следствием межвирусной рекомбинации [198].

SARS-CoV-2 представлен вирионами плеоморфной (как правило сферической) формы со средним диаметром  $108 \pm 8$  нм в диапазоне от 84 до 126 нм [199]. На поверхности вирусных частиц расположены выступающие шипы длиной примерно 9-12 нм, что придает вириону форму короны. Морфология вирионов SARS-CoV-2 имеет сходство с другими представителями семейства *Coronaviridae*, включая SARS-CoV-1 и MERS-CoV [200].

Геном SARS-CoV-2 представлен несегментированной одноцепочечной РНК позитивной полярности размером 29,9 тыс. оснований и состоит не менее чем из 10 основных открытых рамок считывания (ORF) [201]. Трансляция кодируемой вирусом РНК-зависимой РНК-полимеразы (репликазы) необходима для инициации репликации вируса в клетке и синтеза субгеномных вирусных РНК, которые, в свою очередь, служат матрицей для синтеза структурных и вспомогательных белков вируса [202]. Размер ORF1ab, которая кодирует репликазу, составляет 2/3 от размера всего вирусного генома. За ней следуют гены шиповидного белка (S), ORF3a, белка оболочки (E), белка мембраны (M), гены аксессуарных белков ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, нуклеокапсида (N) и ORF10. Кроме того, в исследовании Nelson A. с соавт. было доказано, что SARS-CoV-2 содержит новый перекрывающийся ген (OLG - overlapping gene) - ORF3d, который также имеется у коронавирусов, выделенных у



панголинов в районе Гуанси на юге Китая, но не был обнаружен у других коронавирусов, выделенных у панголинов и летучих мышей [203].

Для коронавирусов SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 шиповидный вирусный белок S инициирует слияние вирусной оболочки с плазматической мембраной клетки-хозяина, а ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) является клеточным рецептором для прикрепления вируса. Рецептором для MERS-CoV является hDPP4 (человеческая дипептидилпептидаза 4 или CD26) [204]. В S-белке выделяют два домена: S1 и S2. Домен S1 опосредует связывание с ACE2, а S2- последующее слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной. Рецептор-связывающий домен (RBD) является ключевым функциональным компонентом в субъединице S1, которая отвечает за связывание SARS-CoV-2 с ACE2 [205]. Кроме того, RBD SARS-CoV содержит ядро и рецептор-связывающий мотив (RBM), который опосредует контакты с ACE2. В то же время на поверхности ACE2 расположены две точки, которые SARS-CoV-2 использует для прикрепления [206]. Стадия адсорбции и проникновения SARS-CoV-2 в клетку зависит не только от ACE2-рецептора, но и от трансмембранной сериновой протеазы TMPRSS2 и пропротеинконвертазы фурина, функцией которых является расщепление S-белка и активация SARS-CoV-2 [207; 208]. Таким образом, SARS-CoV-2 может проникать в клетку двумя различными способами: через позднюю эндосому, где S-белок расщепляется катепсинами, или через раннюю эндосому, используя трипсиноподобные протеазы для расщепления S-белка [207; 209].

Белок E формирует ионные каналы и регулирует сборку вирионов [210]. Белок M также участвует в сборке вирусных частиц [211], тогда как N белок формирует с вирусной РНК рибонуклеопротеиновый комплекс и выполняет несколько функций, таких как усиление транскрипции вирусного генома и взаимодействие с вирусным мембранным белком во время сборки вириона [212]

Рецептор клеток-мишеней, который вирус использует для проникновения в клетку, является фактором, определяющим чувствительность органов и тканей к заражению. Рецептор ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2, ангиотензинпревращающий фермент 2) представлен на поверхности эпителиальных клеток альвеол, трахеи, бронхов, бронхиальных желез, а также альвеолярных макрофагов. Кроме того, ACE2 присутствует в клетках слизистой оболочки роговицы глаза и в бокаловидных и реснитчатых клетках носовой полости, которые, судя по всему, являются первичными целями инфекции [213]. Патогенетический механизм COVID-19 заключается в том, что вирус проникает в клетку, используя рецептор ACE2, и высвобождает одноцепочечную вирионную РНК, которая связывается с рибосомой клетки-мишени и инициирует синтез РНК-репликазы, которая в свою очередь воспроизводит копии геномной и субгеномной РНК, а также фрагменты РНК, которые используются в качестве матрицы для синтеза структурных вирусных белков. Молекулы геномной вирусной РНК позитивной

полярности вместе со структурными вирусными белками формируют новые вирионы SARS-CoV-2, которые высвобождаются из клетки и инфицируют интактные клетки-мишени [2].

### ***Многообразие клинических проявлений COVID-19***

Характер заболевания, вызванного SARS-CoV-2, может различаться у разных людей в широких пределах [214]. В клинической практике наблюдается большая вариабельность клинических проявлений COVID-19 даже среди контактных лиц в пределах одной вспышки заболевания и членов одной семьи [214]. Клиническое течение COVID-19 колеблется от легкой формы до крайне тяжелой [215–217]. Также часто фиксируются случаи бессимптомного течения инфекции. Установлено, что доля случаев бессимптомного носительства может достигать 40-50%, при этом инфицированный человек является источником заражения на протяжении более 14 дней [218]. Кроме того, бессимптомное течение инфекции может быть ассоциировано с субклиническими нарушениями в легких, которые выявляются при проведении компьютерной томографии [218]. Таким образом, SARS-CoV-2 обладает повышенной вирулентностью с «тактическим» преимуществом - его способностью поддерживать передачу от человека к человеку даже при бессимптомном носительстве, что позволяет вирусу быстро распространяться [219].

Согласно докладу Китайского центра по контролю и профилактике заболеваний, в начальном периоде пандемии (первая половина 2020 г.) при анализе 44 500 подтвержденных случаев инфекции с оценкой тяжести заболевания установлено, что умеренная форма течения COVID-19 (без пневмонии или со слабовыраженной пневмонией) наблюдается в 81% случаев [220]. Тяжелая форма (с одышкой, гипоксией или >50-процентным поражением легких) была зарегистрирована в 14% случаев. Заболевание в критической форме (с дыхательной недостаточностью, шоком или полиорганной дисфункцией) наблюдается в 5% случаев, при этом общий уровень летальности составляет 2,3%. Заболевание COVID-19 в тяжелой форме может наблюдаться у практически здоровых людей любого возраста, но преимущественно встречается у лиц старше 65 лет и/или с сопутствующими заболеваниями (сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет, гипертония, хроническое заболевание легких и почек, рак, ожирение, курение), тогда как у большинства лиц среднего возраста инфекция протекает в легкой форме, без осложнений [217; 220; 221]. Было описано несколько осложнений, вызванных COVID-19, среди которых острый респираторный дистресс-синдром - тип дыхательной недостаточности, при котором необходимо проводить реанимационные действия, включая искусственную вентиляцию легких. В такой помощи нуждаются от 12 до 24 % госпитализированных пациентов [222; 223]. Также выявляют сердечно-сосудистые [224], тромбоэмболические осложнения [225], воспалительные реакции [226], суперинфекции [227].

Дети наименее подвержены инфицированию Ухань-подобным вирусом - в общей структуре случаев COVID-19 доля детей варьировала от 1 до 6,3 % [228; 229]. Согласно докладу

Китайского центра по контролю и профилактике заболеваний из 72314 случаев заболевания, зарегистрированных по состоянию на 11 февраля 2020 года, только 2% приходилось на лица в возрасте до 19 лет [220]. У детей с COVID-19 также был описан мультисистемный воспалительный синдром с клиническими признаками, сходными с болезнью Kawasaki и синдромом токсического шока [230]. Мониторинг детской заболеваемости, проведенный в 2020 г. Мескиной Е.Р., показал, что доля бессимптомных форм COVID-19 у детей составляла 62%, в том числе у новорожденных - 73,1%, с низкой частотой тяжелых форм - 0,38% [229].

### ***Генетическая детерминация биологических свойств SARS-CoV-2***

Любые изменения вирусного генома, нарушающие взаимодействия с клеткой хозяина, изменяющие условия для репродукции коронавируса, экспрессию генов хозяина или противодействие иммунитету хозяина, могут изменить степень его контагиозности и вирулентности. Более того, биологические свойства вируса могут изменить одна или несколько точечных мутаций, что было продемонстрировано в ряде исследований. Характер взаимодействия между вирусом и хозяином определяет патогенез коронавирусных заболеваний и, в конечном счете, исход инфекции. На ранних этапах изучения SARS-CoV-2 очень мало было известно о его фенотипическом разнообразии. При описании геномных последовательностей информация о пациенте, как правило, была скудна и ограничивалась возрастом и полом, тогда как информация о тяжести, особенностях и исходе заболевания в большинстве случаев отсутствовала. По истечении четырех лет с начала распространения нового коронавируса в человеческой популяции все больше появляется свидетельств дивергенции SARS-CoV-2 - то есть возникновения геновариантов, отличающихся по биологическим свойствам, что обусловлено высокой пластичностью геномов РНК-вирусов и благоприятными условиями для эволюции вируса.

Остается открытым вопрос о причинах разнообразия клинических проявлений COVID-19 у разных пациентов. Можно предположить, что природа этого явления зависит от генетических особенностей организма хозяина. В соответствии с этой гипотезой генетическая основа восприимчивости к инфекции может быть объяснена полиморфизмом функциональных рецепторов, необходимых для проникновения вируса в клетки-мишени. В частности, наблюдаемая при COVID-19 полиорганная дисфункция, включая фатальные повреждения легких и миокарда, может быть связана с индивидуальными особенностями функциональных характеристик ACE2 рецептора [231–233]. Так, в работе Hou Y. с соавт. на основе анализа ~ 81 000 геномов человека была исследована восприимчивость к COVID-19, обусловленная полиморфизмом генов ACE2 и TMPRSS2 - двух ключевых факторов клетки-хозяина. Было обнаружено, что полиморфизмы ACE2 (такие как p.Arg514Gly в африканской/афроамериканской популяции) ассоциированы с сердечно-сосудистыми и легочными заболеваниями вследствие изменения взаимодействий ангиотензиногена и ACE2.

Уникальные, но распространенные полиморфизмы, включая p.Val160Met (rs12329760) в TMPRSS2, потенциально могут быть причиной дифференциальной генетической восприимчивости к COVID-19 [234].

При помощи полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) было проанализировано 8 582 968 однонуклеотидных полиморфизмов от 1980 пациентов с тяжелой формой COVID-19 из итальянского и испанского эпицентров пандемии в Европе. Исследование не выявило значимых ассоциаций тяжелой формы заболевания с одним геном, при этом выявлена взаимосвязь с полиморфизмами в мультигенном кластере на хромосоме 3 (гены *SLC6A20*, *LZTFL1*, *CCR9*, *FYCO1*, *CXCR6* и *XCRI1*) [235].

Используя методы NGS, китайские ученые провели исследование генетических профилей 332 пациентов с различной степенью тяжести COVID-19. Результаты GWAS свидетельствуют о том, что наиболее значимый локус гена, связанный с тяжестью заболевания, находится в *TMEM189-UBE2V1*, который участвует в сигнальном пути IL-1. Частота миссенс-вариантов p.Val197Met гена *TMPRSS2*, влияющих на стабильность белка, была снижена среди пациентов с тяжелой формой заболевания по сравнению с пациентами с легким течением инфекции и общей популяцией. Кроме того, авторы установили, что аллели HLA-A\*11:01, B\*51:01 и C\*14:02 значительно чаще предрасполагают к тяжелому течению COVID-19 [236]. Таким образом, одной из характеристик SARS-CoV-2 является зависимость его вирулентности от генетических особенностей организма-хозяина, что описано и для других вирусов. Так, среди респираторных вирусов есть данные о разной восприимчивости к ВИЧ-1, генетически детерминированной вариациями хемокиновых рецепторов хозяина [237].

В исследованиях, направленных на изучение молекулярных механизмов патогенности и контагиозности коронавирусов, наибольшее внимание уделяется детерминантам тропизма коронавирусов к клеткам респираторного тракта человека, основанном на рецепторно-опосредованном проникновении вируса в клетку. Эти детерминанты находятся в поверхностном S-белке коронавирусов. Распространено мнение, что именно мутации в эпитопах белка S, ответственных за связывание с вирусными рецепторами, детерминировали возможность межвидовой передачи и адаптации вируса к новому хозяину [238]. Экспериментальное обоснование способности коронавируса летучих мышей с модифицированным методом обратной генетики S-белком преодолевать видовой барьер (инфицировать клетки человека) представлены в работе Menachery V.D. с соавт. [239]. Однако, согласно современным представлениям, S-белок SARS-CoV-2 является не единственным фактором его контагиозности и вирулентности. Ранее на примере высокопатогенного вируса гриппа А птиц подтипа H5N1 экспериментально доказано, что способность распознавать вирусные рецепторы клеток эпителия дыхательных путей млекопитающих может достигаться введением в гемагглютинин (HA) от двух до четырех аминокислотных замен, важных для

связывания НА с  $\alpha 2,6$ -сиаловыми рецепторами. Тем не менее, только этих мутаций оказалось недостаточно для того, чтобы вирус приобрел контагиозность и высокую вирулентность для хорьков [240; 241]. Это свидетельствует о том, что во «внутренних генах» вируса, вероятно, закодированы дополнительные детерминанты контагиозности и вирулентности. Патогенность вируса опосредована не только его способностью эффективно проникать в клетки-мишени, но и множеством других вирусных факторов. Примером тому служат вакцинные штаммы вирусов, входящие в состав живых аттенуированных вакцин. По данным Климова А.И. с соавт., детерминантами аттенуации холодоадаптированного вакцинного штамма вируса гриппа A/Leningrad/134/47/17 являются мутации в генах белков полимеразного комплекса (PB1, PB2, PA, NP), М-белка и неструктурного белка NS2, но не поверхностных белков нейраминидазы и гемагглютинина [242]. В обзорной статье Geoghegan J.L. с соавт. приведено более десяти примеров изменения вирулентности разных вирусов млекопитающих в результате лишь одной или двух аминокислотных замен [189]. Подавляющее большинство этих примеров касается РНК-содержащих вирусов (вирусы гриппа А и В, энтеровирусы, вирус Эбола, ВИЧ, вирус лихорадки Западного Нила, вирус болезни Ньюкасла, вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней и др.).

Вирусы, относящиеся к одному биологическому виду, могут значительно различаться своей вирулентностью, что является результатом дивергенции в ходе эволюции. Смертность при заражении сезонными вирусами гриппа А серотипов H3N2, H1N1 оценивается от 0,04% до 1,0%, тогда как смертность от заболеваний, вызванных отдельными штаммами вируса птичьего гриппа А, в том числе H5N1, H7N7, H9N2, H7N3 и H7N9 достигала 60% [243; 244]. Коронавирусы человека не являются исключением. Так называемые «сезонные» коронавирусы HCoV-NL63, -229E, -OC43, -HKU1 ассоциированы в основном с легкими и среднетяжелыми формами ОРВИ, тогда как коронавирусы животного происхождения - SARS-CoV-1, MERS-CoV и SARS-CoV-2 - с развитием тяжелого острого респираторного синдрома и более высоким риском летальности (от 1 до 40% от числа лабораторно-подтвержденных случаев) [245].

Группа Кунина Е. методами компьютерного анализа выявила возможные генетические детерминанты, определяющие повышенную летальность в результате заражения высоковирулентными коронавирусами - SARS-CoV-1, MERS-CoV и SARS-CoV-2 по сравнению с низковирулентными «сезонными» HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 и HCoV-HKU1 [246]. В результате анализа более чем трех тысяч коронавиральных геномов авторы выявили в геноме высокопатогенных коронавирусов SARS-CoV-1, MERS-CoV и SARS-CoV-2 четыре области (три в гене нуклеопротеина N и одну в гене S-белка), достоверно отличающиеся по аминокислотным последовательностям от сезонных коронавирусов. Отличия в гене N предположительно определяют усиление сигналов ядерной локализации и экспорта этого белка. Отличия в гене S находились в области узнавания рецепторов и слияния вирусной оболочки с

клеточной мембраной и гипотетически отвечают за усиление этапа прикрепления и входа вируса в клетку. Описанные выше результаты проливают свет на вероятные детерминанты вирулентности коронавирусов, но не имеют пока эмпирического подтверждения, поскольку исследование было выполнено методами моделирования *in silico*.

В геноме любого вируса постоянно появляются новые мутации, некоторые из которых способны изменить биологические свойства вируса, включая степень контагиозности вируса, способность «ускользнуть» от иммунного ответа организма-хозяина, вирулентность. Для РНК-содержащего SARS-CoV-2 характерна высокая (но ниже, чем для других РНК-вирусов) частота мутаций [247]. На сегодняшний день известны миллионы геномных последовательностей коронавируса SARS-CoV-2. Результаты исследований лабораторий всего мира пополняют базу данных геномных последовательностей GISAID, которая на сентябрь 2024 года включает информацию о более чем 19,9 млн. полногеномных последовательностей SARS-CoV-2. В GISAID, помимо SARS-CoV-2, представлены геномные последовательности коронавирусов, выделенных у летучих мышей и панголинов. Основываясь на данных о вирусных последовательностях и географическом происхождении образцов из GISAID, другой информационный ресурс Nextstrain [183] размещает филогенетический, географический и геномный анализ SARS-CoV-2 [248]. Благодаря базе данных GISAID и ресурсу Nextstrain за эволюцией вируса можно наблюдать в режиме реального времени. Анализ Nextstrain прогнозирует появление примерно 26 замен в геноме SARS-CoV-2 в год. Учитывая размеры генома SARS-CoV-2 (29,9 тыс. оснований), расчетная скорость эволюции составляет примерно  $0,9 \times 10^{-3}$  замен/сайт/год [190]. Значение этого показателя сопоставимо с показателями, зарегистрированными для SARS-CoV-1 ( $0,8-2,38 \times 10^{-3}$ ) [249], MERS-CoV ( $0,63-1,12 \times 10^{-3}$ ) [250] и HCoV-OC43 ( $0,43 \times 10^{-3}$ ) [251]. Частота мутаций (количество однонуклеотидных замен на сайт за цикл репликации) SARS-CoV-2, скорее всего, будет ниже, чем у других РНК-содержащих вирусов, таких как, например, вирусы гриппа. Это связано с тем, что геном коронавирусов кодирует 3'-5' экзорибонуклеазу (nsp14-ExoN), для которой характерна редактирующая активность [252]. Этим обусловлена высокая стабильность генома коронавирусов, включая SARS-CoV-2. Анализ нуклеотидных последовательностей 48 635 изолятов, проведенный в работе Mercatelli D. с соавт., подтверждает низкую частоту мутаций вируса, которая составила в среднем 7,23 мутации на образец по отношению к эталонным последовательностям генома SARS-CoV-2 (NC\_045512.2) [253].

Следует также отметить, что RBD-домен S-белка SARS-CoV-2 (размер ~90 а.о.), который непосредственно реагирует с рецептором ACE2 на поверхности клеток-мишеней, значительно отличается от RBD SARS-CoV-1, особенно в двух областях, которые взаимодействуют с ACE2, и, кроме того, является самой вариабельной частью SARS-CoV-2 [254]. Последнее предполагает участие нескольких механизмов, задействованных в процессе проникновения вируса в клетку.

Авторы данного исследования определили шесть аминокислотных остатков RBD S-белка (Leu455, Phe486, Gln493, Ser494, Asn501 и Tyr505), которые играют ключевую роль в связывании с ACE2, при этом пять из них отличаются от RBD SARS-CoV-1, что следует учитывать при разработке специфических противовирусных препаратов, блокирующих вход вируса в клетку [254].

Следует отметить, что многочисленные элементы вирусного генома в разной степени подвержены мутациям. В своей работе Vilar S. с соавт. проанализировали около 223 000 полноразмерных последовательностей протеома SARS-CoV-2 и для каждого вирусного белка рассчитали частоту мутаций. Самая высокая частота мутаций была зафиксирована для белков S, NSP12, NS9c и N [255].

Анализ нуклеотидных последовательностей изолятов SARS-CoV-2 выявил несколько областей генома с повышенной частотой мутаций. Среди них следует выделить одну, которая кодирует мутацию S-белка, D614G, в С-концевой области домена S1 [256–258]. Было показано, что мутантный вирус с глицином в остатке 614 (G614), заменяющий аспарагиновую кислоту (D614), доминирует в Европе (данные 2020 г.) [253]. В исследованиях Zhang L. с соавт. сравнивали функциональные свойства S-белка с аспарагиновой кислотой (S<sup>D614</sup>) и глицином (S<sup>G614</sup>) в остатке 614. Было показано, что псевдовirusы, несущие S<sup>G614</sup>, проникают в клетки, экспрессирующие ACE2, более эффективно, чем вирусы с S<sup>D614</sup> [259]. Растущая доля D614G у людей позволила предположить, что вирусы с этой мутацией обладают повышенной контагиозностью. Интересно, что эта мутация, по-видимому, не оказывает существенного влияния на тяжесть течения заболевания [256].

В декабре 2020 года в Великобритании появились сообщения о выделении нового штамма SARS-CoV-2, характеризующегося повышенным уровнем контагиозности [260]. Филогенетический анализ показал, что данный штамм формирует отдельный эволюционный кластер (линия B.1.1.7) [261]. Для этого вируса было идентифицировано 7 характерных мутаций в S-белке: RBD (N501Y, A570D), S1 (ΔH69/V70) и S2 (P681H, T716I, S982A и D1118H) [260]. Мутация N501Y в RBD-домене обеспечивает повышенную аффинность по отношению к ACE2 человека и мыши [262]. Делеция ΔH69/V70 в S1 способствует «ускользанию» вируса от иммунного ответа. Мутация P681H непосредственно примыкает к участку расщепления фурина между S1 и S2 в S-белке. Кроме того, авторы данного исследования представили данные, демонстрирующие наличие нескольких независимых линий SARS-CoV-2, для которых характерна делеция ΔH69/V70 в S-белке и рост циркуляции этих вирусов в некоторых странах Европы, наблюдаемый с августа 2020 года [260].

В январе 2021 года в Южной Африке было зафиксировано появление новой линии SARS-CoV-2 (501Y. V2), которая быстро распространилась и стала доминирующей в нескольких регионах страны. Для этой линии выявлено восемь характерных мутаций в S-белке, включая

три в RBD-домене (K417N, E484K и N501Y), предположительно имеющие функциональное значение. Две из них (E484K и N501Y) расположены в RBM, который непосредственно, взаимодействует с ACE2 [263]. Мутация N501Y также характерна для линии B.1.1.7, зафиксированной в Великобритании. Возможно, именно эта мутация определяет высокий уровень контагиозности SARS-CoV-2.

Также появились сообщения о выявлении новой линии P.1. SARS-CoV-2 в Бразилии [264]. Следует отметить наличие конвергентных мутаций, общих для линий P1, B. 1.1.7 и B. 1.351. Это мутация N501Y в S-белке и делеция в ORF1b (del11288-11296 (3675-3677 SGF) общие для P.1. и британского B.1.1.7, а также мутации в RBD-домене (K417N/T, E484K, N501Y) характерные как для P.1, так и для южноафриканского B.1.351. Набор мутаций/делеций, характерных для линий P. 1, B. 1.1.7 и B. 1.351, вероятно, возник совершенно независимо. Кроме того, мутации, общие для P1 и B. 1.351, по-видимому, связаны с быстрым увеличением числа случаев в регионах, где ранее уже был зафиксирован высокий уровень заболеваемости.

С первых месяцев пандемии важным вопросом была взаимосвязь новых мутаций вируса с его вирулентностью. В ранней работе Khailanya R. с соавт. было проанализировано 95 полноразмерных последовательностей генома SARS-CoV-2, доступных в GenBank на период с декабря 2019 по апрель 2020 года [265]. В результате было обнаружено 116 мутаций, из которых наиболее часто встречались 8782C>T в гене ORF1ab, 28144T>C в гене ORF8 и 29095C>T в гене N. Авторы предполагают, что выявленные мутации могут влиять на вирулентность и контагиозность SARS-CoV-2.

Еще одна попытка исследовать на начальных этапах пандемии взаимосвязь определённых мутаций в геноме SARS-CoV-2 с его вирулентностью была осуществлена в работе Young B. с соавт. [217]. Авторы исследовали влияние 382-нуклеотидной делеции ( $\Delta$ 382) в ORF8 генома SARS-CoV-2 на клинические особенности инфекции. Было установлено, что вариант  $\Delta$ 382 SARS-CoV-2, по-видимому, связан с более легким течением инфекции.

В настоящее время продолжается сбор и анализ данных о взаимосвязи мутаций в геноме SARS-CoV-2 с вирулентностью и контагиозностью вируса. Очевидно, что значительная доля мутаций, влияющих на контагиозность вируса, была обнаружена в S-гене. Уже в 2020 году сформировалось мнение, что это наблюдение должно быть принято во внимание разработчиками вакцин в отношении SARS-CoV-2, подавляющее число которых основано на S-белке [266]. В этот же период высказано предположение, что при разработке вакцин следует использовать и другие белки вируса, включая нуклеокапсид N. Так, в работе Ferretti P. с соавт. было показано, что 90% эпитопов при Т-клеточном ответе расположено в ORF1ab гена нуклеокапсида N SARS-CoV-2 [267].



### *Систематизация и географическая распространенность вариантов SARS-CoV-2*

Молекулярно-генетический мониторинг новой коронавирусной инфекции на ранних этапах пандемии и филогенетический анализ позволил выделить геноварианты SARS-CoV-2, отличающиеся своей географической распространённостью. В литературе описано несколько подходов к классификации геновариантов SARS-CoV-2. Так, Forster P. с соавт. в начале пандемии выделял три основных варианта SARS-CoV-2 (A, B, C), которые различаются аминокислотными заменами. При проведении филогенетического анализа близкородственный коронавирус летучих мышей BatCoV-RaTG13, выделенный в провинции Юньнань [268], был определен как предковый и размещен в основу филогенетического древа (кластер A) [269]. Авторы выделили два подкластера A, которые различаются синонимичной мутацией T29095C. Вариант B произошёл от A в результате двух мутаций: синонимичной мутации T8782C и несинонимичной мутации C28144T, изменяющей лейцин на серин. При этом тип C отличается от своего родительского типа наличием несинонимичной мутации G26144T, которая изменяет глицин на валин [269]. Типы A и C встречались в основном в Европе и Америке. Напротив, тип B являлся наиболее распространенным типом в Восточной Азии, и его предковый геном, видимо, не распространился за пределы Восточной Азии, что предполагает наличие иммунологической или экологической устойчивости к этому типу за пределами Азии [269]. Эти исследования дополнены группой ученых из Гонконга, которые провели филогенетический и филодинамический анализ 247 геномных последовательностей SARS-CoV-2, доступных в базе данных GISAID на 5 марта 2020 года [270]. Среди них авторы идентифицировали четыре генетических кластера, названные «супер-распространителями» (super-spreaders, SS), т.е. вирусы, которые вызвали крупные вспышки заболевания COVID-19 в разных странах мира. Так, SS1 был широко распространен в Азии и США и в основном ответственен за вспышки в штатах Вашингтон и Калифорния, а также в Южной Корее, тогда как SS4 способствовал развитию пандемии в Европе. Используя сигнатурные мутации каждого SS в качестве маркеров, авторы дополнительно проанализировали 1539 последовательностей генома SARS-CoV-2, зарегистрированных после 29 февраля 2020 года, и обнаружили, что 90% этих геномов являлись «супер-распространителями», причем SS4 был доминирующим [270]. Проводя параллели с работой Forster P. с соавт. следует отметить, что вирус, идентифицированный как SS1, эквивалентен типу B, SS2 – типу C, а тип A - предковый вариант [269]. Результаты географического распространения разных типов вирусов совпадает у обеих групп авторов.

Согласно исследованиям, проведенным в 2020 г. Tang X. с соавт., популяционный генетический анализ 103 геномов SARS-CoV-2 показал, что вирусы разделяются на два основных типа, обозначенные как L и S, которые различаются полиморфизмом в сайте 84 (S84L) гена ORF8 [271]. Несмотря на то, что тип L (~70%) более распространен, чем тип S (~30%), результаты эволюционного анализа предполагают, что тип S, скорее всего, является предковым

вариантом SARS-CoV-2. Кроме того, авторы предполагают, что тип L более агрессивен и распространяется быстрее, чем тип S, и вмешательство человека, возможно, изменило соотношение L-и S-типов вскоре после первой вспышки SARS-CoV-2. Однако неясно, является ли L-тип результатом эволюции S-типа коронавируса человека или промежуточных хозяев, как и то, различаются ли L-тип и S-тип по вирулентности [271].

Для того чтобы оценить связь генетических мутаций с уровнем вирулентности вируса Zhang X. с соавт. провели исследование клинических, молекулярных и иммунологических характеристик 326 пациентов с подтвержденной инфекцией SARS-CoV-2 в Шанхае [2]. В результате проведенного анализа было идентифицировано две основных филогенетических клады. Клада I включала несколько подгрупп, характеризующихся различиями в ORF3a: p.251G>V (субклада V), или в S-гене: p.614D>G (субклада G). Клада II отличается от клады I наличием двух связанных мутаций в ORF8: p.84L>S (28144T>C) и ORF1ab: p.2839S (8782C>T). Такая классификация не согласуется с S/L- типированием, несмотря на то, что она основана на тех же двух связанных полиморфизмах [271]. Кроме того, авторы не выявили существенных различий в частоте мутаций и контагиозности у вирусов, относящихся к кладе I или II, а также в клинических особенностях вызываемых ими заболеваний.

Еще один подход к систематизации генетических вариантов SARS-CoV-2 представлен в исследовании Hahn G. с соавт. [272]. При сравнении полноразмерных вирусных геномов авторы рассчитывали коэффициент сходства Жаккара, при этом не включали в анализ информацию о географическом происхождении образцов и не проводили компьютерного моделирования эволюционных взаимоотношений различных геновариантов SARS-CoV-2. Несмотря на это, результаты предоставленного анализа отражают хронологическое распространение SARS-CoV-2 по всему земному шару, начиная с первых случаев заболевания, наблюдавшихся в Китае, и заканчивая вспышками заболевания в Европе и Северной Америке. Кроме того, основываясь на данных о нуклеотидной последовательности 7 640 геномов SARS-CoV-2 из базы данных GISAID, сделан вывод о том, что вирусы группируются в четыре отдельные генетические подгруппы [272].

В исследовании Kumar S. с соавт. (Темплский университет) на основе анализа десятков тысяч геномов SARS-CoV-2 удалось выявить его прародительский штамм [273]. Со временем мутации в геноме предкового вируса дали начало семи доминантным линиям, которые распространились по разным континентам. Использование технологии молекулярного баркодирования позволило установить, что североамериканские коронавирусы содержат геномные последовательности, отличные от коронавирусов, циркулировавших в то же время в Европе и Азии [273].

Несмотря на многообразие подходов к классификации SARS-CoV-2, описанных в литературе, консорциум GISAID сформировал собственную, обобщенную систему

классификации, согласно которой выделяют 7 основных филогенетических клад (на основе характерных наборов мутаций): S, L, V, G, GH, GR, GV [158]. Согласно исследованиям Mercatelli D. с соавт. клады G и GR преобладали в Европе, в то время как S и GH - в основном в Северной и Южной Америке. Референсная клада L в основном была представлена последовательностями из Азии [253]. В 2020 г. вирусы клады G и ее потомки - GH и GR являлись наиболее распространенными кладами среди секвенированных геномов SARS-CoV-2, на долю которых в глобальном масштабе приходилось 74% всех известных последовательностей. В частности, клада GR, несущая комбинацию мутаций S-белка D614G и N-белка RG203KR, была наиболее широко распространена во всем мире. Исходный вирусный штамм, представленный кладой L, по-прежнему составлял 7% от числа секвенированных геномов [253].

В исследовании Sengupta A. с соавт. был проведен анализ 1566 последовательностей генома SARS-CoV-2, изолированных в десяти азиатских странах [274]. Изоляты сравнивали с эталонной последовательностью «родительского» штамма WIV04 (GenBank ID MN996528.1) для идентификации мутаций, выявленных в различных областях генома. Проведенный *in silico* анализ продемонстрировал, что изоляты из десяти азиатских стран формируют клады G, GH, GR, L, S, O и V, при этом самый высокий уровень мутаций был зафиксирован в кладах GH и GR [274].

Классификация GISAID дополняется более детальной динамической системой номенклатуры, предложенной Rambaut A. с соавт. [275]. Согласно этой системе классификации выделяют 81 сублинию SARS-CoV-2, причем большая их часть относится к линиям A, B и B.1. Авторы выделили шесть сублиний, производных от линии A (обозначаемой A.1–A.6), и две сублинии-потомки A.1 (A.1.1 и A.3). Также было описано 16 сублиний - производных линии B. Линия B.1, включавшая на апрель 2020 года 70 сублиний, являлась преобладающей. Линия B.2 положила начало шести сублиниям. Согласно этой классификации клады S, V, G, GH, GR, GV соответствуют линиям A, B.2, B.1, B.1\*, B.1.1. [253]. На основе этой системы было разработано программное обеспечение Pangolin, которое позволяет автоматически классифицировать новые геномы [182, 184].

Еще один подход к систематизации описан в работе Hodcroft E. с соавт. [183]. Авторы предлагают указывать в названии год выявления штаммов, входящих в определенную кладу, которая формируется из штаммов, которые циркулируют в течение нескольких месяцев и имеют характерное географическое распространение. Согласно этой классификации, в 2020 году выделяли следующие клады: 19A, 19B, 20A, 20B, 20C. Клады 19A и 19B преобладали в Азии в начале пандемии, тогда как 20A была детектирована в Европе в начале 2020 года. Клада 20B также распространилась в Европе, тогда как 20C в основном в Северной Америке.

В 2021-2022 гг. продолжалось формирование удобной и понятной системы классификации пандемического SARS-CoV-2. В связи с появлением множества эпидемически значимых вариантов SARS-CoV-2 ВОЗ создала собственную систему их классификации, которая предусматривает выделение вариантов, вызывающих озабоченность (variants of concern – VOCs). VOCs характеризуются рядом доказанных признаков, которые могут включать повышенную контагиозность, более тяжёлое течение заболевания, увеличение числа летальных исходов, или значительное снижение нейтрализующей активности сывороток реконвалесцентов COVID-19 или вакцинированных лиц. VOCs согласно классификации ВОЗ обозначают буквами греческого алфавита – Alpha, Beta, Gamma и т.д. (Таблица 1) [276]. Наибольшее число охарактеризованных штаммов вируса приходилось на варианты Delta (B.1.617.2) и Omicron (B.1.1.529), ставшие причиной самых масштабных подъемов заболеваемости как во всем мире, так и в РФ [277–279]. Вторая группа вариантов, представляющих интерес (variants of interest), включает штаммы с мутациями, которые ассоциированы с изменением аффинности связывания с рецепторами, ослаблением нейтрализации антителами, увеличением контагиозности, снижением эффективности лечения, прогнозируемым увеличением тяжести заболевания. В третью группу входят варианты под наблюдением (variants under monitoring), для которых предполагается влияние на скорость передачи вируса и эффективность лечения, но их доля со временем снизилась до практически нулевого уровня.

Таблица 1 - Варианты SARS-CoV-2, вызывающие озабоченность [276]

VOCs	Линия по Pango	Клада по GISAID	Клада по Nextstrain	Первое упоминание
Alpha	B.1.1.7	GRY	20I (V1)	Великобритания, сентябрь 2020 г.
Beta	B.1.351	GH/501Y.V2	20H (V2)	ЮАР, Май 2020 г.
Gamma	P.1	GR/501Y.V3	20J (V3)	Бразилия, ноябрь 2020 г.
Delta	B.1.617.2	G/478K.V1	21A, 21I, 21J	Индия, октябрь 2020 г.
Omicron	B.1.1.529	GR/484A	21K, 21L, 21M, 22A, 22B, 22C, 22D	Разные страны, ноябрь 2021 г.

В конце января 2020 года первые случаи заражения SARS-CoV-2 были зафиксированы в России, а с мая 2020 года Россия входила в число четырех стран с наибольшим количеством подтвержденных случаев COVID-19. В России пандемический подъем заболеваемости начался позже, чем во многих соседних европейских странах, возможно, благодаря своевременно принятым мерам по ограничению транспортного сообщения с Китаем. Филогенетический анализ изолятов SARS-CoV-2, выделенных в России, показал, что большинство образцов соответствовали линиям B.1, B.1.1 и B.1\* (номенклатура PANGOLIN) или кладам G, GR и GH

(номенклатура GISAID), которые были широко распространены в Европе [280], причем самой распространенной генетической линией была GR / 20B / B.1.1 (номенклатура GISAID, Nextstrain, Pangolin, соответственно) [281]. Козловская Л. с соавт. установили, что в первые месяцы пандемии российские изоляты SARS-CoV-2 характеризовались низкой частотой мутаций, при этом большинство исследованных геновариантов SARS-CoV-2 содержали специфический набор из семи нуклеотидных мутаций по сравнению с родоначальным уханьским вирусом, включая аминокислотные замены в белках S и N [282].

На территории России мониторингом распространения известных и новых вариантов SARS-CoV-2 занимается ряд научных организаций под общим руководством Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор). В соответствии с Постановлением Правительства РФ от 23.03.2021 N 448 «Об утверждении Временного порядка предоставления данных расшифровки генома возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» в Федеральном бюджетном учреждении науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) разработана и введена в действие Российская платформа агрегации информации о геномах вирусов (Virus Genome Aggregator of Russia - VGARus) [278]. База данных VGARus содержит информацию о нуклеотидных последовательностях вариантов SARS-CoV-2, циркулирующих в различных регионах России. VGARus дает возможность вести постоянный мониторинг генетической изменчивости SARS-CoV-2, предоставляя важнейшие данные для обнаружения новых геновариантов и отслеживания их распространённости на территории России. По состоянию на 1 февраля 2023 года в базу было загружено 230893 геномных последовательностей, из которых 138907 полногеномных последовательностей SARS-CoV-2 и 91986 фрагментов геномов [283].

### ***Эпидемиологические аспекты вакцинопрофилактики COVID-19***

Вакцинопрофилактика является эффективным подходом к снижению заболеваемости и смертности от вирусных заболеваний [284]. Для специфической профилактики COVID-19 применяются вакцины, основанные на вирусных векторах, самореплицирующихся РНК, рекомбинантных и нативных вирусных антигенах [79; 285–288]. Эти технологические платформы позволяют быстро разрабатывать безопасные вакцины, способные вызывать протективный иммунный ответ. Разработка и широкое применение вакцин позволили значительно снизить частоту госпитализации и смертности от заболевания [285; 288]. Однако, лицензированные вакцины, как правило, имеют высокую себестоимость производства, включают неполный набор протективных вирусных антигенов, обеспечивают непродолжительный иммунный ответ, при этом их эффективность снижается при появлении новых эпидемически значимых вариантов SARS-CoV-2. Так, вариант Delta (B.1.617.2), сменивший в общей структуре заболеваемости в середине 2021 года варианты Alpha, Beta и Gamma, обладал повышенной контагиозностью и хуже нейтрализовался антисыворотками,

полученными от реконвалесцентов COVID-19, перенесших инфекцию более ранними геновариантами [289–291]. На смену варианту Delta пришел высококонтагиозный Omicron (B.1.1.529), который уже к февралю 2022 г. занял доминирующую позицию, составляя более 95% всех охарактеризованных секвенированием штаммов (Рисунок 5) [158]. Вариант Omicron имеет несколько делеций в геноме и более 30 аминокислотных замен в S-белке, которые привели не только к повышению контагиозности вируса, но и способности «ускользнуть» от нейтрализации антителами из сывороток реконвалесцентов COVID-19 и вакцинированных лиц [292–297]. Как следствие, моноклональные антитела, которые использовались в терапии COVID-19, также оказались неэффективны в отношении варианта Omicron [296].

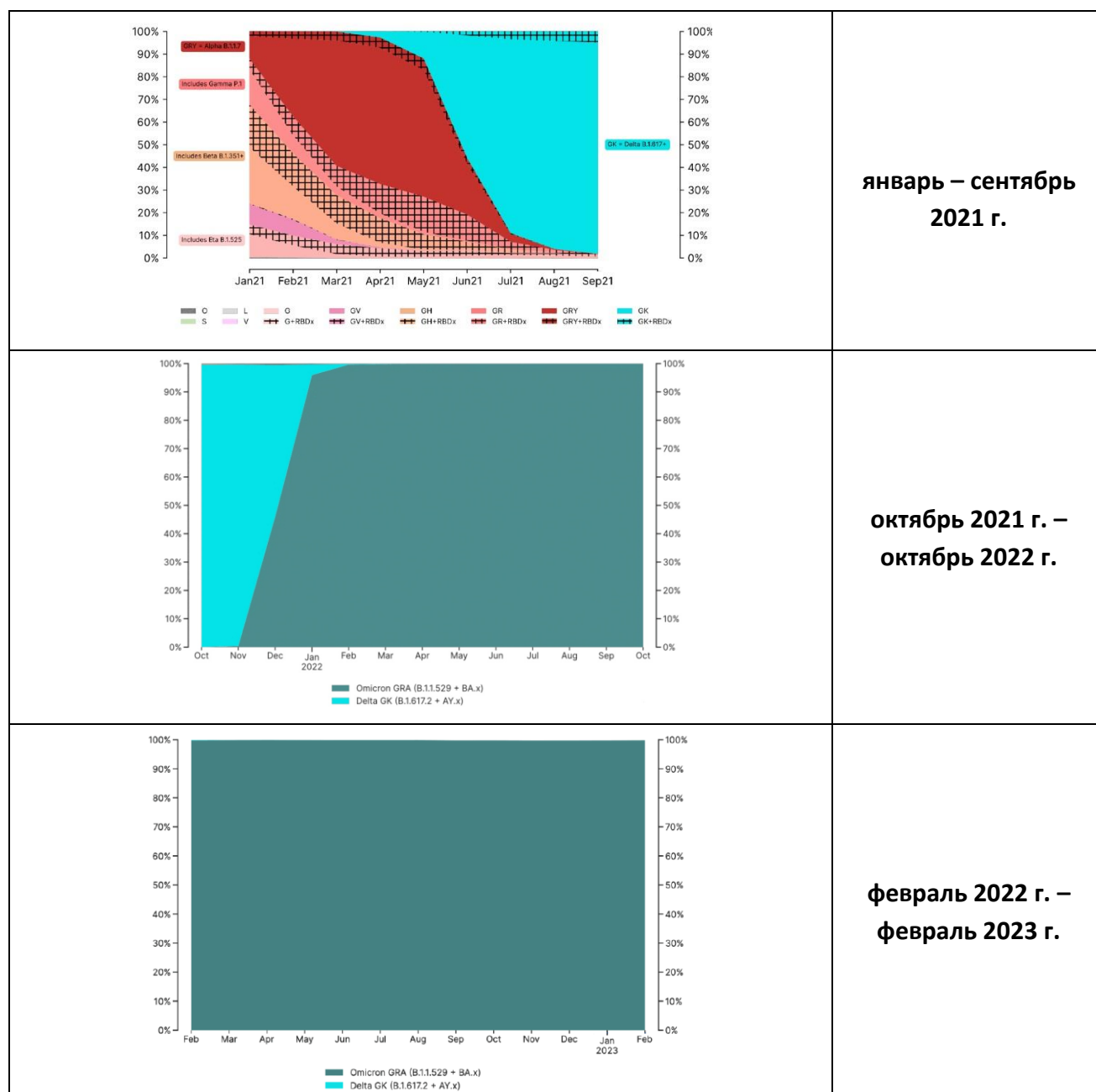


Рисунок 5 - Распределение генетических вариантов SARS-CoV-2 в мире, охарактеризованных секвенированием, в различные периоды пандемии (адаптировано по: GISAID, 2023 [158])

Распределение геновариантов SARS-CoV-2 в разные периоды пандемии в РФ имело свои региональные особенности. В России динамический мониторинг мутационной изменчивости SARS-CoV-2 осуществляется с декабря 2020 г., когда был обнаружен первый случай завоза в приграничных с Китаем территориях (28.12.2020) варианта Alpha (B.1.1.7) [278]. Первый случай завоза возбудителя на европейскую часть страны зафиксирован 02.03.2020 г. [279]. За весь период наблюдения (30.03.2020–07.03.2023) на территории РФ всего зарегистрировано более 22 млн. случаев заболевания. Динамическое наблюдение за развитием эпидемической ситуации на территории РФ в этот период позволила выделить 5 подъёмов заболеваемости (Таблица 2) [279].

Таблица 2 - Характеристика подъёмов заболеваемости COVID-19 в России [279]

Подъем заболеваемости	Продолжительность (недель)	Период	Зарегистрировано случаев COVID-19	Среднее значение уровня заболеваемости (на 100 тыс. населения)
1-й	22	30.03.2020-30.08.2020	987 989	30,7
2-й	36	31.08.2020-09.05.2021	3 889 936	93,0
3-й	18	10.05.2021-12.09.2021,	2 259 808	85,9
4-й	17	13.09.2021-09.01.2022	3 510 779	141,3
5-й	11	10.01.2022-27.02.2022	5 640 267	442,3

Пятый подъем сопряжен с наивысшим уровнем заболеваемости в 442,3 случаев на 100 тыс. населения, обусловленным широким распространением варианта Omicron, что является отражением его повышенной контагиозности и способности преодолевать поствакцинальный, либо приобретенный в результате перенесенной ранее инфекции, иммунитет [279].

Как видно из Рисунка 6, появление и распространение новых вариантов вируса в России в целом соответствовало общемировым тенденциям, но происходило с задержкой на 1-3 месяца [278]. Если в период с января по июнь 2021 года доминирующего варианта не было (в разной степени были распространены варианты B.1.1, B1.1.317, B.1.1.523, B.1.1.7 (Alpha) и другие), то с июля 2021 года более 90% всех охарактеризованных секвенированием штаммов приходилось на вариант Delta, а с февраля 2022 года по настоящее время доминирует вариант Omicron и его потомки.

Как показал анализ результатов секвенирования полных геномов нескольких миллионов изолятов вируса, дальнейшая эволюция вируса SARS-CoV-2 связана с появлением и распространением сублиний варианта Omicron [158]. Родительские сублинии варианта Omicron

(ВА.1- и ВА.2-подобные) имели широкое распространение в мире до июня 2022 года, далее их практически полностью вытеснили сублинии ВА.4- и ВА.5 и их потомки - ХВВ.1, ХВВ.1.5, ВQ.1.1 и другие (Рисунок 7).

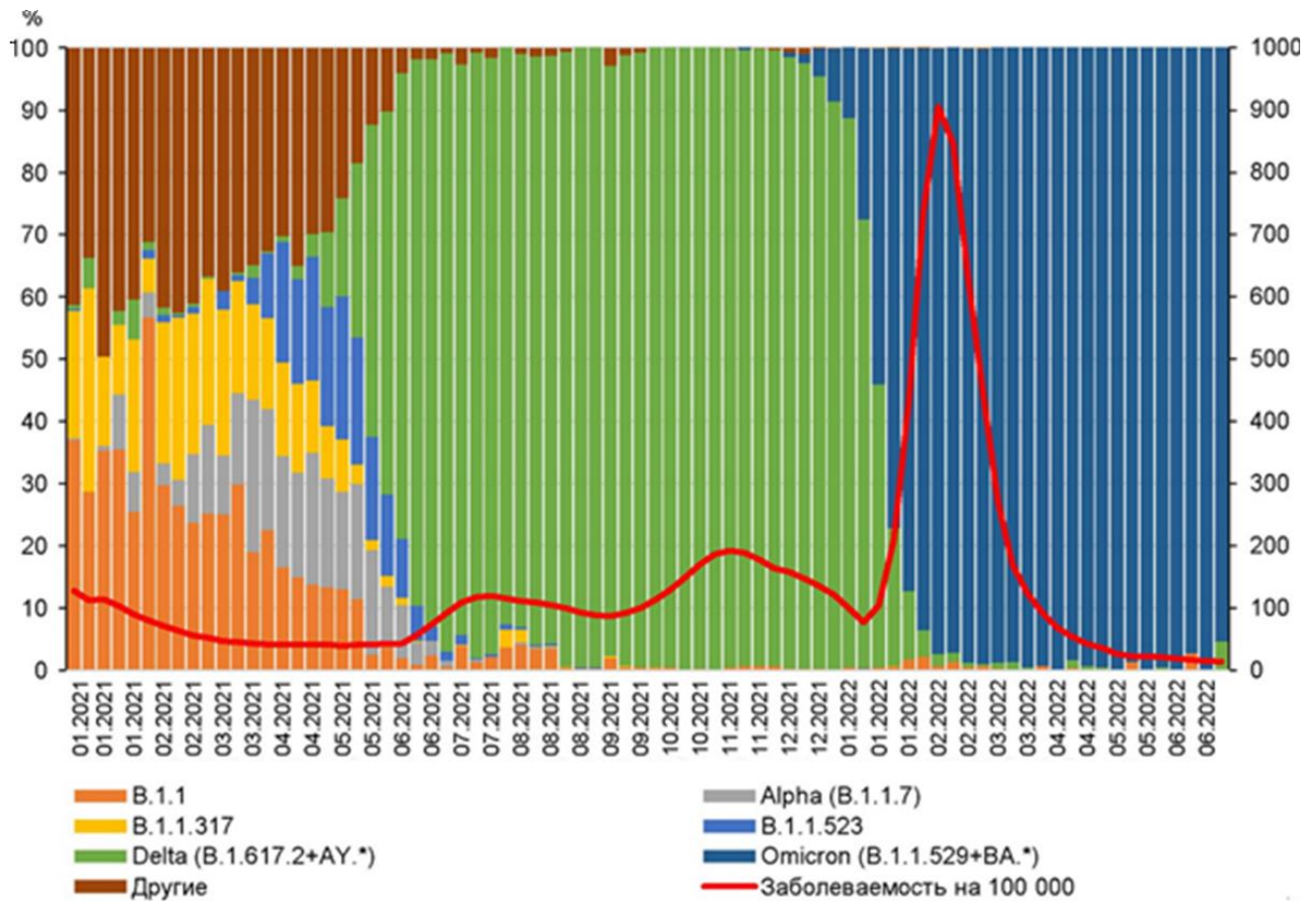


Рисунок 6 - Долевое распределение вариантов SARS-CoV-2 в период с января 2021 г. по июнь 2022 г. и заболеваемость населения COVID-19 (на 100 тыс. населения) на территории России (адаптировано по: Акимкин В.Г. и др., 2022 [278])

Анализ распространения сублиний варианта Omicron в разных странах на протяжении 2022 года показал, что эпидемический процесс можно разделить на четыре этапа (Рисунок 8). На первом этапе, с декабря 2021 года по март 2022 года, во всем мире превалировала сублиния ВА.1 варианта Omicron и ее потомки - ВА.1, ВА.1.1, ВА.1.17 и ВА.1.15. На втором этапе, с апреля 2022 года по июль 2022 года, преобладала сублиния ВА.2 и ее потомки - ВА.2.11, ВА.2.10 и ВА.2.75. На третьем этапе - с августа 2022 г. по декабрь 2022 г. – основной сублинией являлась ВА.5 и ее потомки ВА.5.2, ВА.5.2.1, ВF.7 и ВQ.1.1. На четвертом этапе, с декабря 2022 года, доля сублинии ВА.5 и ее потомков постепенно уменьшались, а доля ВА.2.75 и ХВВ и их потомков быстро увеличивались. Поскольку сублинии ВА.2.75 и ХВВ зародились в Азии, Сингапур и Австралия вступили в четвертую стадию раньше, чем Великобритания и США (Рисунок 8) [298].



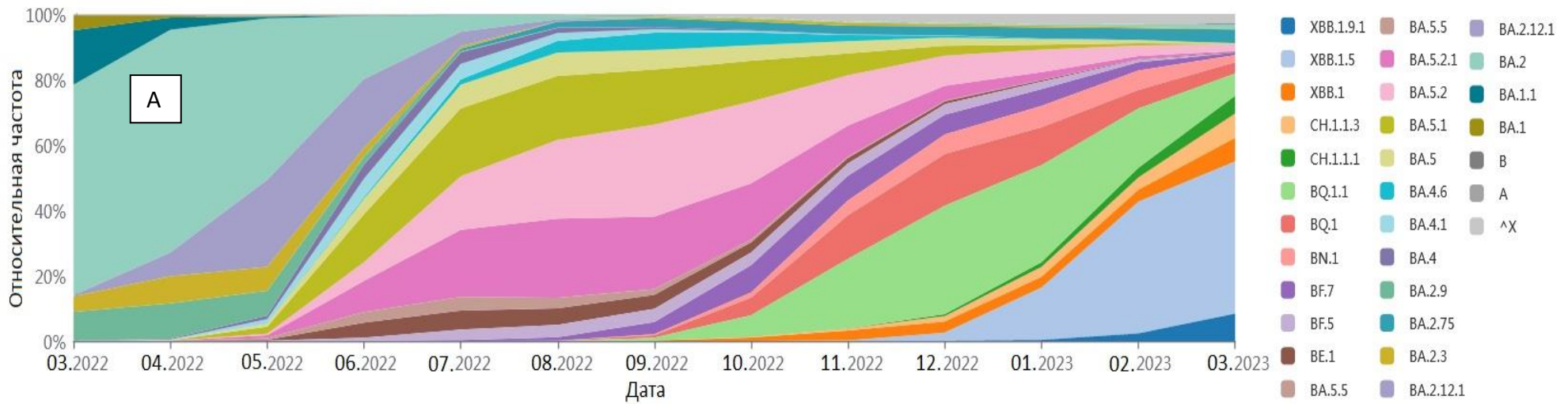
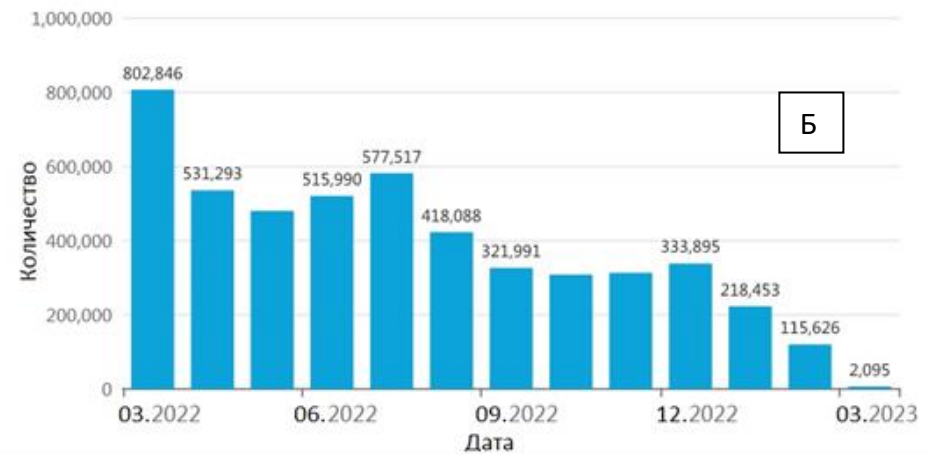
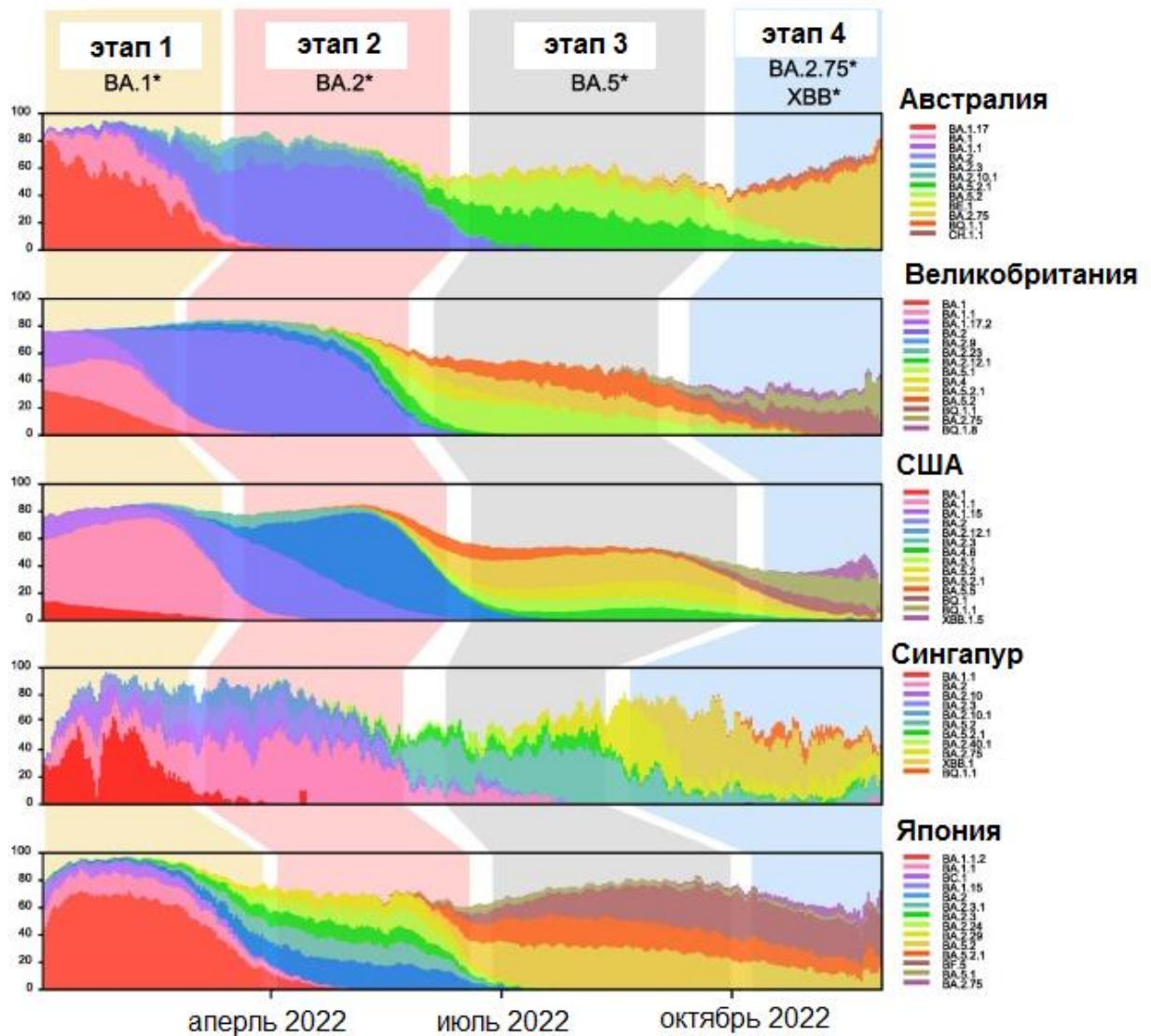


Рисунок 7 - Динамика относительной частоты встречаемости (А) и распределение по месяцам количества секвенированных геномов сублиний варианта SARS-CoV-2 Omicron в мире (Б) (адаптировано по: GISAID, 2023 [154])





Разные цвета обозначают разные сублинии.

Рисунок 8 - Распространенность различных сублиний варианта Omicron в течение 2022 года в Австралии, Великобритании, США, Сингапуре и Японии (адаптировано по: Sun Y. и др., 2023 [298])

Интернет-ресурс GISAID позволяет отслеживать распространение геновариантов вируса в отдельно взятой стране при условии, что из этой страны регулярно поступают данные секвенирования геномов SARS-CoV-2. В период с марта 2022 по март 2023 года в базе данных GISAID депонировано около 32000 полных геномов SARS-CoV-2, циркулировавших на территории РФ (Рисунок 9). Наименьшее количество секвенированных штаммов вируса в месяц в течение этого периода составило 577, наибольшее – 8459, что свидетельствует о хорошей репрезентативности выборки. Субвидовая классификация российских изолятов SARS-CoV-2 показала, что с марта по июнь 2022 года в общей структуре превалировала сублиния BA.2, но в период с июля по октябрь 2022 г. ее сменили потомки сублинии BA.5 (BA.5.2, BA.5.2.1 и другие). Начиная с октября 2022 г. BA.5-подобные сублинии постепенно стали вытесняться сублиниями XBB.1, XBB.1.9, CL1 и другими.

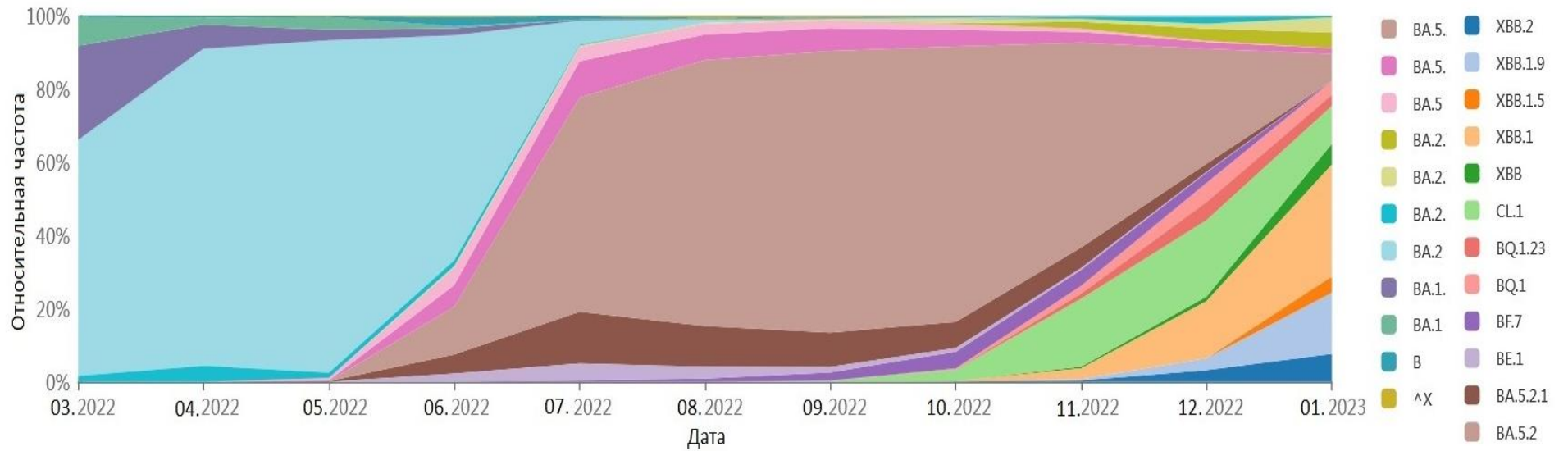
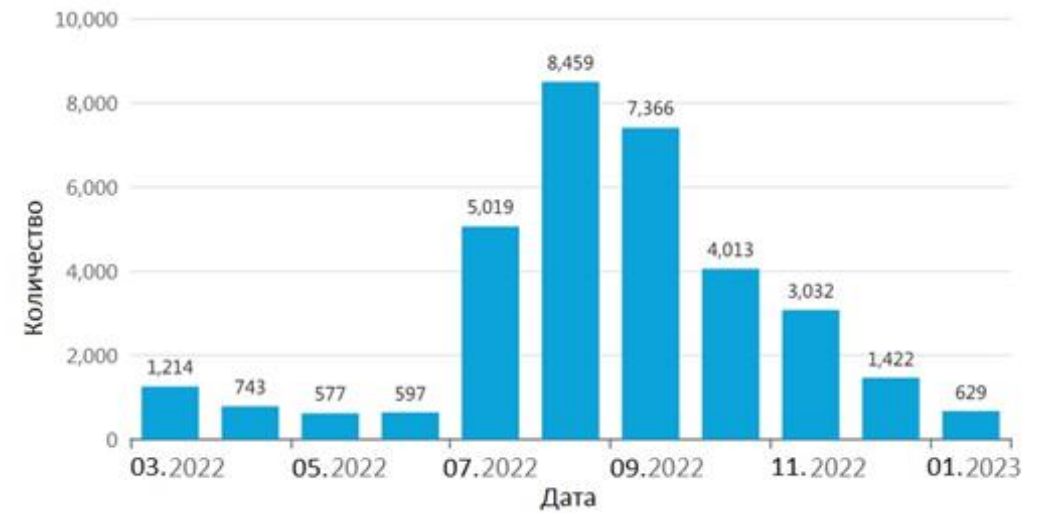


Рисунок 9 - Динамика относительной частоты встречаемости (А) и распределение по месяцам количества секвенированных геномов сублиний варианта SARS-CoV-2 Omicron (Б) в России (адаптировано по: GISAID, 2023 [154])



В начале 2023 г. наблюдалось «возвращение» геновариантов Omicron BA.2 в виде рекомбинантных форм сублинии XBB - XBB.1.5 (Kraken), XBB.1.16 (Arcturus), XBB.1.9.2.1 (EG.5, Eris), доминировавших в течение большей части 2023 г. [299]. В конце августа 2022 г. начал распространяться новый вариант SARS-CoV-2 – BA.2.86 (Pirola), который имел дополнительные мутации по сравнению с предыдущими сублиниями Omicron [300]. Первые случаи заражения BA.2.86 были впервые выявлены в России в начале ноября 2023 г., а с января–февраля 2024 г. начала активно распространяться сублиния BA.2.86 JN.1, ставшая доминирующей как во всем мире, так и в нашей стране [299].

Сублинии варианта Omicron SARS-CoV-2 подразделяются на две основные эволюционные ветви BA.2- и BA.5-подобные (Рисунок 10). Растущее число серопозитивных лиц, включая вакцинированных, либо ранее инфицированных людей, делает «ускользание» от приобретенного иммунитета основным фактором отбора и движущей силой эволюции SARS-CoV-2. Таким образом, история распространения разных вариантов в стране или регионе влияет на трансмиссию вируса и его эволюцию на этой территории. В странах с предшествующей историей доминирования сублинии BA.2 быстро растет доля случаев COVID-19, вызванных BA5-подобными штаммами (например, в Индии и Сингапуре); тогда как, в странах, где ранее доминировала сублиния BA.5, растет доля случаев с BA2-подобными штаммами (например, в Австралии, Соединенном Королевстве и США) [298]. Антигенные различия между двумя сублиниями - BA.2 и BA.5 велики, а перекрестная иммунная защита слабая, что помогает одной «ускользнуть» от вируснейтрализующих антител, вырабатываемых в отношении другой. В результате непрерывной эволюции SARS-CoV-2 генетические и антигенные различия SARS-CoV-2 между BA.2- и BA.5-подобными вирусами будут еще больше увеличиваться, а способность к перекрестной иммунной защите уменьшаться. Sun Y. с соавт. высказал предположение, что в будущем эти два варианта развития станут чередующимися эпидемиями [298].

Опыт массовой вакцинопрофилактики COVID-19 показал, что в период доминирования варианта Omicron лицензированные вакцины способны обеспечить определенный уровень защиты от тяжелой формы COVID-19 и летального исхода [301; 302]. Однако, уровень поствакцинальной защиты от заражения и симптоматической инфекции вариантом Omicron составляет даже для признанных наиболее эффективными мРНК-вакцин только 40-50% в первые 3 месяца после иммунизации (п.и.), а далее быстро снижается до 10-20% [301–304]. Бустерная иммунизация позволяет восстановить данный показатель до исходных значений, однако продолжительность возникающего иммунитета не превышает 3-6 месяцев [302; 303; 305–307]. Лицензированные вакцины (инактивированные, векторные, рекомбинантные, мРНК-вакцины) основаны на S-белке SARS-CoV-2 и направлены на формирование преимущественно

гуморального иммунитета, обусловленного вируснейтрализующими антителами. Изменчивость S-белка и появление новых VOCs приводит к быстрому «ускользанию» вируса от иммунологического надзора и снижению эффективности таких вакцин [292; 294; 297; 308; 309]. Продолжающаяся в настоящее время эволюция варианта Omicron привела к появлению таких его сублиний, которые «ускользают» от адаптивного иммунитета, вызванного даже перенесенной инфекцией родительскими сублиниями Omicron. Так, сублинии BF.7, BQ.1, and XBB (которые появились после сублинии BA.4/5), «ускользают» от нейтрализации антителами, антителозависимой клеточной цитотоксичности и фагоцитоза, индуцированных прорывной инфекцией сублинии BA.1 [310]. Кроме того, Chen J. с соавт. показал, что сублинии BF.7 и BQ.1 обладают высокой устойчивостью к нейтрализации широкой панелью из 77 моноклональных антител, эффективно нейтрализующих Ухань-подобный вирус [311].

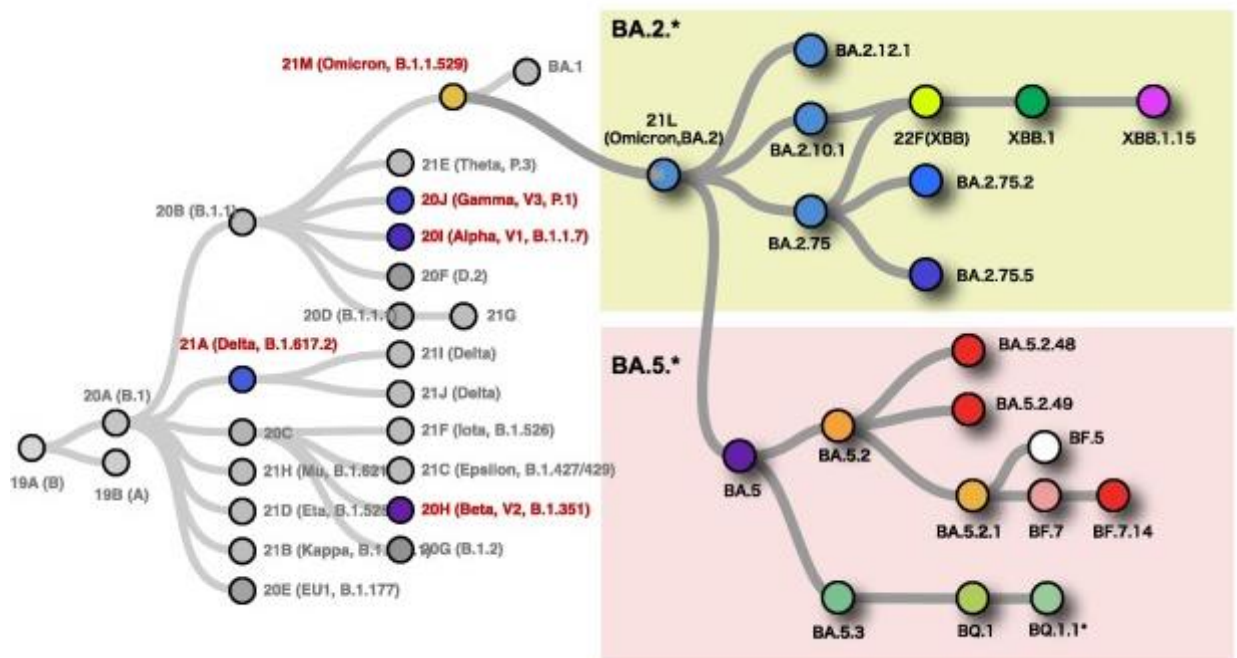


Рисунок 10 - Филогенетические взаимоотношения основных сублиний варианта Omicron SARS-CoV-2, включая сублинии BA.2. и BA.5. и их потомков, а также более ранних вариантов – потомков родительского Ухань-подобного вируса (адаптировано по: Sun Y. и др., 2023 [298])

### 1.3 Методические подходы к аттенуации респираторных вирусов при разработке живых аттенуированных вакцин

#### 1.3.1 Конструирование вакцинных штаммов для живых гриппозных вакцин

При конструировании вакцин против COVID-19 важно учитывать опыт создания вакцин против других респираторных инфекций, из которых наиболее показательными являются вакцины против гриппа. Для специфической профилактики сезонного гриппа существует

несколько разновидностей вакцин, в том числе: инактивированные гриппозные вакцины (ИГВ), рекомбинантные вакцины на основе вирусных белков и живые гриппозные вакцины (ЖГВ) [74]. ИГВ в свою очередь подразделяются на цельновирионные, субъединичные и расщепленные вакцины. Технология производства как ИГВ, так и ЖГВ предусматривает совместное инфицирование куриных эмбрионов штаммом, рекомендованным ВОЗ, и вирусом-донором [312]. Сегментированный геном вируса гриппа А (ВГрА) позволяет получить вирус-реассортант, содержащий поверхностные гликопротеины (гемагглютинин и нейраминидаза) рекомендованного ВОЗ штамма и шесть «внутренних» генов донорского штамма, отвечающего производственным требованиям, при этом вакцинный штамм отбирается с использованием нейтрализующих антител против гемагглютинина и нейраминидазы донорского штамма.

При конструировании ЖГВ в качестве донора аттенуации в США использовали холодоадаптированный штамм A/Ann Arbor/6/60 H2N2, содержащий четыре мутации (PB2: N265S; PB1: K391E, E581G и A661T; и NP: D34G). Доноры аттенуации, которые использовались для подготовки штаммов ЖГВ в России (А/Ленинград/134/47/57 (H2N2) и В/СССР/60/69), были созданы еще в 70-е годы в СССР Институте экспериментальной медицины (г. Ленинград) [313]. Они были созданы методом пассирования эпидемических вирусов в аллантоисной полости развивающихся куриных эмбрионов при пониженной до 25°C температуре в результате чего приобрели полную безвредность для человека, но сохранили способность вызывать выраженный гуморальный, секреторный и клеточный иммунный ответ [242; 314]. Доноры аттенуации в процессе холодной адаптации приобрели мутации, определяющие *ts* и *att* фенотип вакцинного штамма, позволяющие ему размножаться при низких температурах (ниже 33°C), но ограничивающие репродукцию вируса при температуре 37°C и выше [131, 314]. Генетические детерминанты аттенуации представляют собой ряд аминокислотных замен во внутренних генах, которые способны обеспечивать авирулентность вакцинного штамма как кооперативно, так каждая мутация по отдельности, что определяет стабильность *att* фенотипа [74; 242; 315; 316]. Важно отметить, что ЖГВ способны обеспечить такие преимущества перед рекомбинантными и инактивированными вакцинами, как имитация естественного воздействия вируса на клетки слизистой дыхательных путей, что обеспечивает формирование местного мукозального иммунитета, активацию как гуморального, так и клеточного звеньев иммунитета, долгосрочную защиту, высокий уровень перекрестной протективной активности против дрейфовых вариантов вируса [317]. Однако в настоящее время ЖГВ применяется ограниченно и рекомендуется только для иммунокомпетентных групп населения, что значительно ограничивает возможности здравоохранения в борьбе с распространением вируса гриппа [74].

В последние годы при конструировании профилактических вирусных вакцин широко применяются методы обратной генетики. Наиболее активно клонирование искусственно-модифицированных вирусных геномов применяется в конструировании вакцин против гриппа и COVID-19.

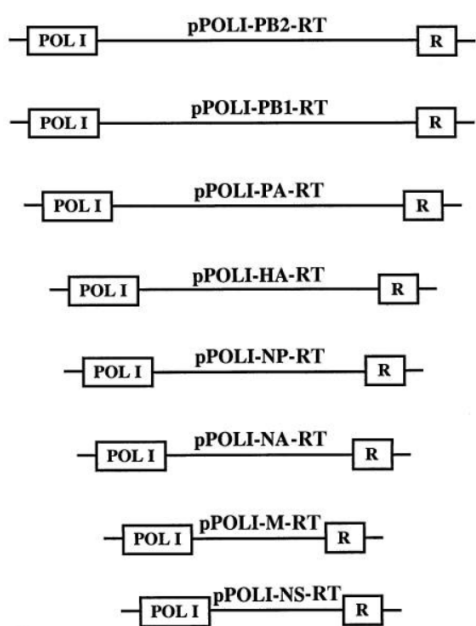
### *Методы целенаправленной модификации генома вируса гриппа*

Вирусы гриппа человека являются оболочечными, имеют сегментированный РНК-геном негативной полярности и относятся к семейству *Orthomyxoviridae*, родам *Alphainfluenzavirus* (вид *Alphainfluenzavirus influenzae*, синоним - вирус гриппа А), *Betainfluenzavirus* (вид *Betainfluenzavirus influenzae*, синоним - вирус гриппа В), *Gammmainfluenzavirus* (вид *Gammmainfluenzavirus influenzae*, синоним - вирус гриппа С).

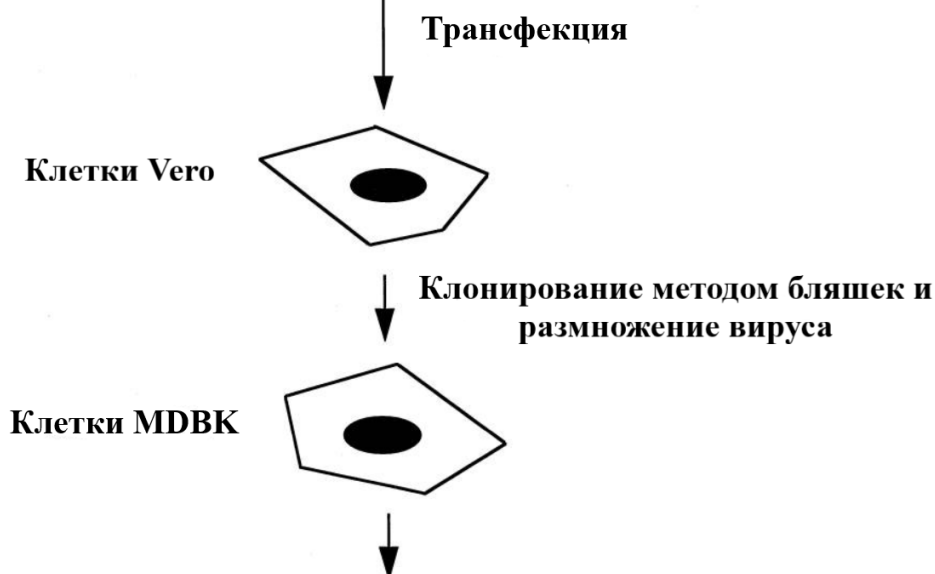
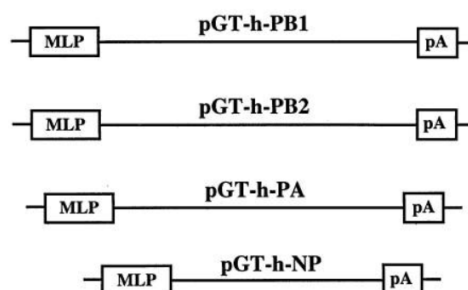
Ключевым фактором эволюции ортомиксовирусов является генетическая реассортация – обмен сегментами генома между разными вирусами гриппа одного вида в результате коинфекции клетки-мишени разными геновариантами вируса [318]. Для репликации и транскрипции вирусного генома вирусам гриппа требуется функционально активный вирусный рибонуклеопротеиновый комплекс, который состоит из вирусной геномной РНК, нуклеопротеина (NP) и вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) в виде комплекса из трех белков - PB1, PB2 и PA [319]. Первоначально подходы к целенаправленной модификации генома вируса гриппа А включали использование вирусов-помощников [320; 321]. Первые системы обратной генетики, не требующие применения вирусов-помощников, были разработаны на рубеже тысячелетий [322; 323]. Эти системы требовали применения для одновременной трансфекции чувствительных клеток четырех или более плазмид под контролем промотора РНК-полимеразы II (Pol II) для синтеза белков полимеразного комплекса, а также восьми плазмид для синтеза восьми сегментов вирусной РНК под контролем промотора РНК-полимеразы I (Pol I) (Рисунок 11) [322].

Количество плазмид, необходимых для воспроизведения инфекции, в системах, разработанных разными научными группами, варьировало от 10 до 17 в зависимости от количества сегментов вирусного генома и организации плазмид, кодирующих вирусные белки-помощники [322–327]. Дальнейшее развитие систем обратной генетики вируса гриппа позволило сократить общее количество необходимых плазмид до 8 или менее благодаря использованию двунаправленной системы экспрессии [328; 329]. В этой системе промотор для РНК-полимеразы I человека, вместе с мышинным Pol I-терминатором, контролирует синтез вирионной РНК, а предранний цитомегаловирусный промотор для РНК-полимеразы II отвечает за синтез вирусной мРНК (Рисунок 12) [328].

## Плазмиды для транскрипции



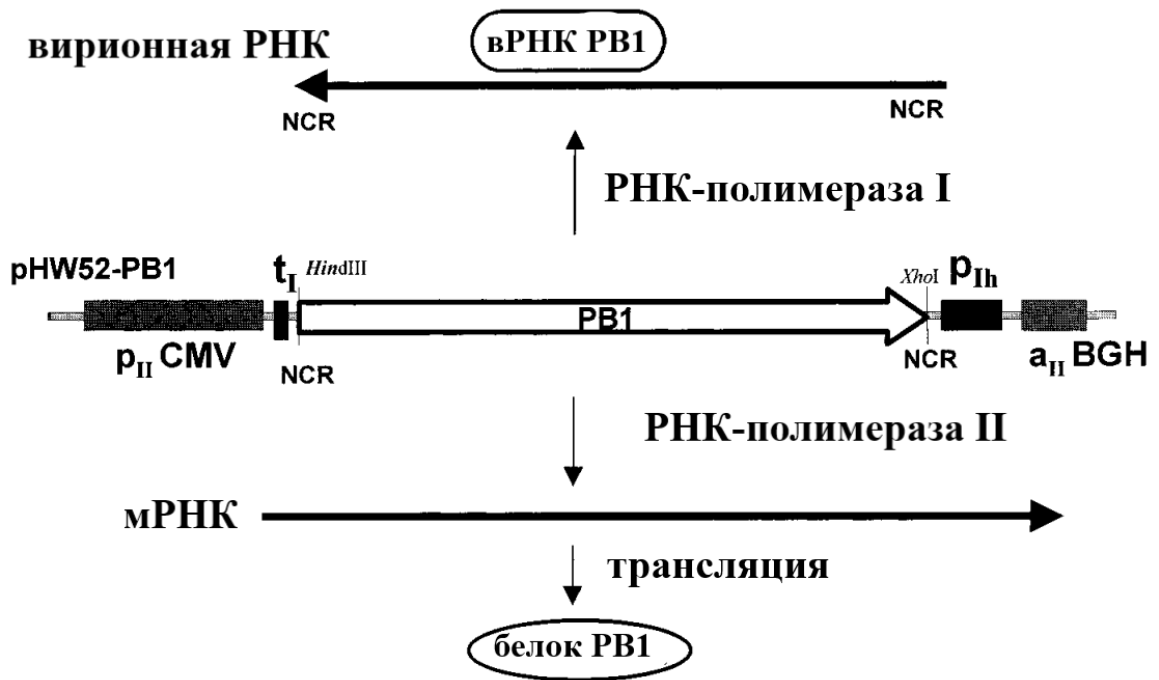
## Плазмиды для экспрессии белков



Для получения инфекционного вируса по 5 мкг каждой из плазмид, кодирующих белки полимеразного комплекса (pGT-h-PB1, pGT-h-PB2 и pGT-h-PA), 10 мкг плазмиды, кодирующей белок NP pGT-h-NP и по 3 мкг каждой из восьми транскрипционных плазмид, кодирующих вирионную РНК (pPOLI-PB2-RT, pPOLI-PB1-RT, pPOLI-PA-RT, pPOLI-HA-RT, pPOLI-NP-RT, pPOLI-NA-RT, pPOLI-M-RT и pPOLI-NS-RT) смешивали с реагентом для липосомальной трансфекции DOTAP (Boehringer), и добавляли к клеткам Vero. Через 24 ч трансфекционную смесь удаляли, и клетки инкубировали с 8 мл свежей среды, которую заменяли ежедневно в течение 4 дней. Собранную среду из трансфецированных чашек исследовали на наличие инфекционного вируса гриппа методом бляшек и размножения в клетках MDBK. POL I - укороченный промотор РНК-полимеразы I человека; R - рибозим вируса гепатита дельта; MLP - поздний промотор аденовируса 2-го типа; pA - сигнал полиаденилирования вируса SV40.

Рисунок 11 - Схематическое изображение системы воспроизведения инфекции вируса гриппа А на основе 12 плазмид (адаптировано по: Fodor E. и др., 1999 [322])





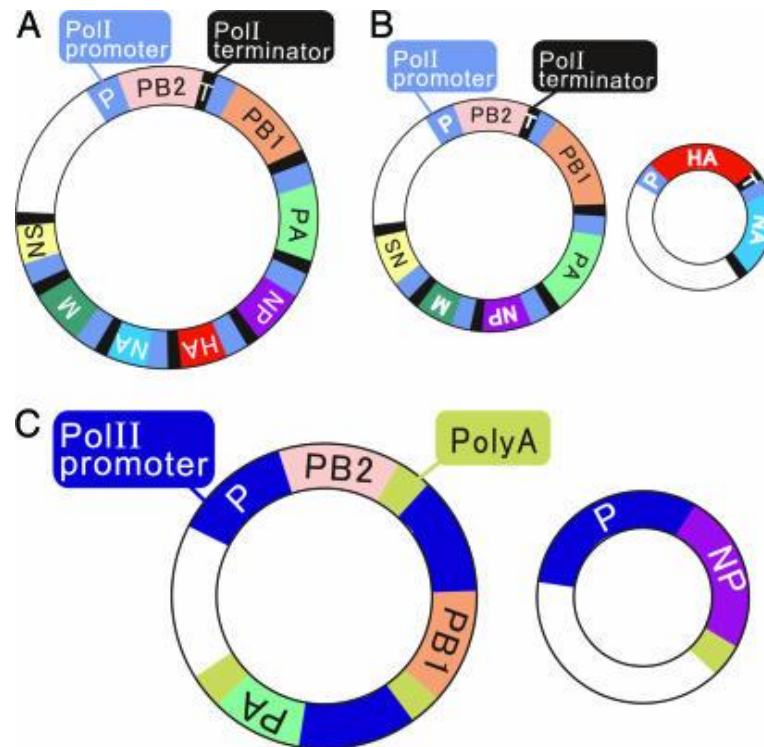
Вектор для клонирования рНВ12 содержит промотор РНК-полимеразы II (рIIСMV) цитомегаловируса человека и сигнал полиаденилирования (аIIВGH) гена гормона роста коров. Между этими элементами вставлен мышинный терминатор (tI) и промотор человеческой РНК-полимеразы I (рIh). NCR – некодирующий регион.

Рисунок 12 - Система двунаправленной транскрипции pol I/pol II (адаптировано по: Hoffmann E. и др., 2000 [328])

Одна из проблем получения рекомбинантного вируса заключалась в том, что культуры клеток млекопитающих, используемые при производстве вакцин, такие как клетки почек африканской зеленой мартышки (Vero) или клетки почек собак (MDCK), с трудом поддаются трансфекции. Использование видоспецифичных промоторов позволило повысить эффективность воспроизведения инфекции в этих клеточных линиях [330; 331]. Недавним достижением стало создание плазмидных конструкций, объединяющих в одной молекуле ДНК до 8 генов вируса гриппа А под контролем промотора Pol I, и до 3-х генов на дополнительной плазмиде, под контролем промотора Pol II [332] (Рисунок 13). Этот подход повышает вероятность того, что одна клетка при трансфекции получит все вирусные гены, необходимые для начала инфекционного процесса.

Доступность систем обратной генетики, применяемых для изучения структуры и функций белков вируса гриппа, произвела революцию в стратегии разработки и технологии производства гриппозных вакцин. В течение многих лет применялась трехвалентная вакцина, состоявшая из трех компонентов - 2 штаммов вируса гриппа А (подтипы H1N1 и H3N2) и 1 штамма вируса гриппа В, рекомендованных ВОЗ перед следующим сезоном гриппа. Эти

вакцины изготавливались с использованием либо живого аттенуированного, либо инактивированного вируса, выращенного в куриных эмбрионах.



(А) плазмида для транскрипции всех восьми вирионных РНК вируса гриппа А на одной матрице. Единицы транскрипции, включающие промотор РНК-полимеразы I человека (голубой цвет, Pol I promoter), кДНК, кодирующую сегмент генома вируса гриппа в обратной ориентации (показаны разными цветами), и терминатор РНК-полимеразы I мыши (черный цвет, Pol I terminator), объединены в одной плазмиде с использованием уникальных сайтов рестрикции. (В) две плазмиды для транскрипции шести и двух вирионных РНК вируса гриппа, соответственно. (С) две плазмиды для транскрипции мРНК белков PB2, PB1 и PA на одной плазмиде, и мРНК белка NP на другой. Единицы транскрипции, включают промотор РНК-полимеразы II (синий цвет, Pol II promoter), например, куриный  $\beta$ -актиновый промотор, кодирующую последовательность для соответствующего вирусного белка (показаны разными цветами) и сигнал полиаденилирования (желтый цвет, polyA), были объединены на одной плазмиде с использованием уникальных сайтов рестрикции.

Рисунок 13 - Схематическое изображение молекулярных клонов вируса гриппа А в виде плазмид, несущих до 8 вирусных генов (адаптировано по: Neumann G. и др., 2005 [332])

Современные стратегии вакцинации включают применение четырехвалентных вакцин, созданных с применением методов обратной генетики, которые могут выращиваться в культурах клеток животных, а не в куриных эмбрионах, или нарабатываться в виде вирусоподобных частиц в культуре клеток насекомых *S. frugiperda* (Sf9) [333–339]. В 2013 году FDA (США) одобрила вакцину против сезонного гриппа, состоящую из очищенного белка гемагглютинаина, полученного с использованием бакуловирусной системы экспрессии [340]. Рекомбинантные вакцины успешно применяются для вакцинации лиц в возрасте от 18 до 49 лет

и представляют собой важный этап в разработке и внедрении вакцин против гриппа нового поколения, поскольку эта система сокращает время разработки и производства по сравнению с традиционным подходом на основе куриных эмбрионов [341].

Методы обратной генетики применяются и при создании ЖГВ, в том числе при получении реассортантов на основе штаммов доноров аттенуации и эпидемических вирусов гриппа. В частности, с этой целью применяется трансфекция чувствительных клеток 8-ю плазмидами с двунаправленной транскрипцией с промоторами Pol I/Pol II [74; 328] с последующим выделением штаммов реассортантов вирусов гриппа из культуральной жидкости трансфицированных клеток. Совершенствование ЖГВ методами обратной генетики происходит по нескольким направлениям, представленным ниже.

**Оптимизация донорских штаммов.** На протяжении длительного времени в качестве донорских штаммов для создания сезонных вакцин использовались A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) или A/Ленинград/134/17/57 (H2N2) в Соединенных Штатах и России, соответственно. Со временем стало наблюдаться снижение эффективности ЖГВ в профилактике сезонного гриппа, в основе которого лежит ряд причин [342]. Одной из причин предположительно является нарастание со временем антигенных отличий «внутренних» генов (PB2, PB1, PA, NP, M и NS) донорских штаммов от генов циркулирующих вирусов, что ограничивает эффективность противовирусного клеточного иммунного ответа [342; 343]. Таким образом, наиболее эффективным средством профилактики сезонного и потенциального пандемического гриппа могла бы стать созданная методами обратной генетики платформа ЖГВ, основанная на современных донорских штаммах, где сегменты «внутренних» вирусных генов лучше соответствуют сегментам циркулирующих штаммов.

**Получение донорского штамма с отсутствующим или дефектным геном NS1-белка.** Неструктурный белок 1 ВГрА (NS1) играет важную роль в «ускользании» вируса от врожденного иммунитета [344; 345]. В ряде работ стратегии аттенуации ВГрА, основанные на делеции и/или укорочении NS1, были испытаны на моделях гриппа птиц [346–350], собак [351], лошадей [352], свиней [353–356] и человека [357–359]. Мутантные по гену NS1 вирусы рассматриваются как многообещающие кандидатные вакцинные штаммы, поскольку их репродукция у хозяина снижена под влиянием интерфероновидного ответа, при этом они способны индуцировать протективный иммунный ответ [74].

**Модификация генов NS1 и/или PA-X.** Белки PA-X и NS1 вируса гриппа А являются факторами вирулентности, которые модулируют врожденный иммунный ответ хозяина при заражении, обеспечивая репродукцию вируса. Недавние исследования показали, что эти два вирусных фактора могли эволюционировать вместе для поддержания необходимого равновесия в ингибировании экспрессии генов хозяина [360]. В ряде работ для увеличения профиля

безопасности вакцин путем генетических модификаций была изменена функциональная активность белков PA-X и NS1 и получены донорские штаммы вируса с улучшенной аттенуацией [361; 362]. Устранение способности PA-X ингибировать экспрессию генов хозяина ограничивает репликацию штамма донора аттенуации *in vivo* при сохранении высокого уровня протективной активности [361], что позволяет рассматривать модификацию NS1 и/или PA-X как стратегию создания ЖГВ для вакцинации лиц, которым в настоящее время противопоказано применение живых вакцин [74].

**Синонимичное перекодирование генома.** Универсальность генетического кода, в котором различные аминокислоты могут кодироваться более чем одним кодоном [363], позволяет перекодировать вирусные геномы путем «деооптимизации кодонов», что привело к появлению нового поколения ЖАВ. В процессе эволюции и адаптации к человеку вирусы гриппа синонимично изменили кодоны, кодирующие вирусные белки, на кодоны, наиболее совместимые с клетками хозяина, что позволяет дикому вирусу эффективно в них размножаться [364; 365]. Методами синтетической биологии и обратной генетики путем синонимичного перекодирования генома было получено несколько вакцинных штаммов [366–370]. Деоптимизация кодонов вирусного генома предоставляет ряд преимуществ при разработке ЖГВ, включая: а) возможность модуляции степени аттенуации, которая зависит от деоптимизированного гена(ов) и размера модифицированной последовательности; б) сохранение иммуногенных свойств при высокой степени аттенуации; в) сохранение высокого уровня вирусной репродукции в клеточных линиях, одобренных Управлением по контролю за продуктами питания и лекарствами (FDA, США) для производства вакцин; г) сведение к минимуму риска реверсии вирулентности [366–370].

**ЖГВ, основанные на рекомбинации вирусного генома.** Одним из подходов к аттенуации вируса гриппа является конструирование методами обратной генетики рекомбинантных вирусов, содержащих модифицированные сегменты М и/или NS. У дикого вируса сегменты М и NS кодируют с помощью перекрывающихся рамок считывания по два разных вирусных белка (M1 и M2, или NS1 и NEP, соответственно) [371]. Разрезание перекрывающихся открытых рамок считывания белков M1/M2 (сегмент М) и/или белков NS1/NEP (сегмент NS) с использованием сайта авторасщепления тешовируса свиней серотипа 1 (TBC-1) позволило получить вирусы с нарушенным сплайсингом в этих сегментах генома [372]. Полученные таким образом рекомбинанты с модифицированным сегментом М проявляли аттенуационный фенотип для мышей, но были способны при однократной иммунизации обеспечить полную защиту от заражения летальной дозой вируса [372]. Альтернативная стратегия была использована для создания двухкомпонентной ЖГВ против ВГрА H5N1 и H9N2, где с целью аттенуации вируса были проведены перестроения генов PB1, PA и NS [373]. В другой работе

были модифицированы сегменты генома НА и NA с целью получения двухвалентной ЖАВ против ВГрА Н1 и Н3, что предоставляет возможность разработки новых сезонных ЖГВ [374].

**Вакцинные штаммы с одним циклом репродукции.** В ряде работ получены и исследованы мутанты ВГрА, содержащие замены или делеции в генах, необходимых для завершения жизненного цикла [375–377]. Для размножения таких мутантных штаммов недостаток вирусного гена должен быть компенсирован *in trans* стабильно трансфецированными клеточными линиями, восполняющими недостающий вирусный белок [375; 377]. Методами обратной генетики было получено множество мутантов с одним циклом репродукции, в том числе с нарушенными вирусными генами PB2, PB1, PA, NA или NA [375; 377–390]. С помощью репликационно-некомпетентных мутантов были исследованы механизмы упаковки вирусного генома [378; 383]; идентифицированы факторы хозяина, важные для вирусной репродукции и новые противовирусные препараты и вируснейтрализующие антитела [375; 376; 391]; получены кандидатные вакцинные штаммы и обоснована их безопасность, иммуногенность и протективная активность в качестве средств специфической профилактики [379–382; 384; 385; 387–389]. Важно отметить, вакцинные штаммы с одним циклом репродукции более безопасны, чем ЖАВ, поскольку их репродукция в чувствительных клетках ограничена, но более иммуногенны, чем инактивированные вакцины, поскольку в зараженных клетках происходит накопление значительного количества вирусного антигена [377].

**Встраивание кодона преждевременной терминации.** Для аттенуации ВГрА также предложено введение в различные сегменты генома кодонов преждевременной терминации [392], основанные на технологии расширения генетического кода [393]. При таком подходе трансгенная чувствительная культура клеток с механизмом ортогональной трансляции продуцирует вирусы, способные размножаться только в этой клеточной линии, но неспособные к репродукции в родительских клетках и/или *in vivo* [392]. В экспериментах на мышах, морских свинках и хорьках показано, что ВГрА с кодонами преждевременной терминации генетически стабильны и способны индуцировать стойкий гуморальный и клеточный иммунный ответ, способный защитить животных от заражения как гомотипичными, так и гетеротипичными штаммами ВГрА [392]. В ряде работ исследуется возможность использования технологии расширения генетического кода для конструирования живой репликационно-некомпетентной вакцины против ВИЧ-инфекции [394; 395]. В то же время, Нао R. с соавт. отмечают, что амбер-кодона в системах ортогональной трансляции отличаются недостаточной стабильностью, что было продемонстрировано на генетически-модифицированном вирусе ящура [396].

### 1.3.2 Подходы к получению вакцинных штаммов вируса краснухи

Возбудителем краснухи является вирус *Rubivirus rubella* (вирус краснухи), род *Rubivirus*, семейство *Matonaviridae*, отряд *Hepelivirales*. Геном вируса краснухи, представленный одноцепочечной РНК позитивной полярности, заключен в икосаэдрический капсид, окруженный липопротеиновой оболочкой. До 2020 года вирус краснухи относился к роду *Rubivirus* семейства *Togaviridae*, отряд *Martellivirales*. Вирион вируса краснухи представляет собой частицу сферической формы с икосаэдрическим типом симметрии диаметром 60-70 нм [397]. Он содержит липидную оболочку с гликопротеинами E1 и E2, выступающими на поверхности на 5-8 нм с утолщенным дистальным концом [397; 398]. Вирус краснухи представлен одним серотипом, вызывает заболевание только у человека. Передается вирус воздушно-капельным путем при кашле и чихании поражает слизистые оболочки верхних дыхательных путей, поэтому условно его можно отнести к категории респираторных вирусов.

История борьбы с краснухой представляет собой пример успешной вакцинопрофилактики инфекционных заболеваний, чему способствовала разработка высокоэффективной живой аттенуированной вакцины. Вакцинация направлена на ликвидацию как краснухи, так и синдрома врожденной краснухи. Благодаря массовой вакцинопрофилактике заболеваемость краснухой в развитых странах сведена к минимуму. Так, в США в 2004 году было объявлено о ликвидации эндемичной краснухи, в то время как в Японии до сих пор регистрируются вспышки заболевания [399]. В РФ заболеваемость краснухой на протяжении последних лет крайне низкая. Например, в 2021 году, по данным Роспотребнадзора, в стране зарегистрировано только два случая краснухи, в следующем 2022 году – не зарегистрировано ни одного случая, тогда как в 2023 году – 3 случая [584].

Существует два подхода к вакцинопрофилактике краснухи (*Rubella vaccines: WHO position paper. 2020*). Первый подход является более комплексным и сочетает вакцинацию детей в рамках НКИ с вакцинацией лиц старших возрастных групп, что позволяет заблокировать передачу вируса и ведет к элиминации и краснухи, и связанного с ней синдрома врожденной краснухи (СВК). Второй подход заключается в проведении профилактической вакцинации девочек-подростков, женщин детородного возраста и направлен на снижение частоты возникновения синдрома врожденной краснухи. Первый подход принят в США и РФ, второй - в Японии и Великобритании [399].

Опыт вакцинопрофилактики краснухи в Японии выявил его недостатки – в условиях иммунизации только девочек и женщин детородного возраста циркуляция вируса не только сохранилась, но и сформировались условия для его распространения [400]. Количество зарегистрированных случаев краснухи в Японии увеличилось до 378 в 2011 году, 2386 в 2012 году и 14 344 в 2013 году [399]. Распространенность краснухи в 2013 году показала, что в

Японии остается много восприимчивых взрослых мужчин [399]. В 2018 и 2019 гг. вспышки краснухи охватили японские мегаполисы ( $n = 2941$  и  $2306$ , соответственно), причем на долю взрослых приходилось примерно 95% всех зарегистрированных случаев, а на долю мужчин - примерно 80% [399; 400].

Число стран, где вакцина против краснухи была введена в НКИ, в 2000 году составляло 99, а к 2019 году увеличилось до 173 [401]. Согласно Глобальному плану действий по вакцинации на 2020 год, краснуха по состоянию на 2019 год была ликвидирована только в Америке. Элиминация краснухи была подтверждена в 93 (48%) из 194 стран, включая весь регион Северной и Южной Америки [402]. Число больных краснухой людей на 1 000 000 человек во всем мире сократилось с пятнадцати в 2010 году до семи в 2019 году [402]. В 2012 году число зарегистрированных случаев краснухи составляло 94 277, но к 2019 году оно снизилось до 49 136, а к 2020 году - до 10 194 [402]. Уменьшение числа пациентов с краснухой в 2020 году, возможно, было связано с введенными ограничениями на фоне борьбы с COVID-19, такими как социальное дистанцирование, ношение масок, что предотвращало и распространение вируса краснухи.

Вирус краснухи был впервые изолирован в культуре клеток в 1962 году двумя независимыми группами: Parkman P.D., Buescher E.L., Artenstein M.S. и Weller T.H., Neva F.A. В 1966 году на основе дикого штамма вируса краснухи M33 путем пассирования на клетках почки зеленой мартышки AGMK был получен первый аттенуированный штамм HPV-77 [403]. В ряде стран мира путем длительного пассирования клинических изолятов вируса краснухи на различных линиях клеток при пониженной температуре получены штаммы, которые были использованы для создания живых аттенуированных вакцин против краснухи [404]. Описание пассажной истории полученных вакцинных штаммов представлено в Таблице 3.

Всего в мире зарегистрировано девять живых аттенуированных вакцин, основанных на разных штаммах вируса краснухи (HPV-77/DE5, Wistar RA27/3, Cendehill, BRD-2, Matsuba vaccine, TCRB19 vaccine, Takahashi vaccine, Matsuura vaccine и TO-336 vaccine), полученных путем пассирования изолятов вируса при пониженной температуре [405].

Выращивание разных штаммов вируса проводили в различных клеточных линиях, а количество пассажей варьировало от 30 до 90. Для всех вакцинных штаммов аттенуация проводилась при пониженной температуре (от 28 до 35°C) и сопровождалась накоплением мутаций и приобретением *ts* фенотипа. Количество и локализация мутаций, возникших в процессе аттенуации у разных вакцинных штаммов, различались. Так, в геноме штамма TO-336 vaccine было выявлено 6 аминокислотных замен, а в штамме Matsuura vaccine – 19. Такая разница может быть обусловлена различиями в условиях аттенуации, например, разной видовой принадлежностью клеток, на которых проводились пассажи вируса. Так, для

получения штамма TO-336 vaccine проводили 7 пассажей на клетках почки обезьян верветок VMK, 20 пассажей на первичных клетках почки морской свинки и 3 пассажа на клетках почки кролика RK [406].

Таблица 3 - Вакцинные штаммы вируса краснухи [406]

Вакцинный штамм	Дикий штамм	Год получения	Страна	Пассажная история (количество пассажей – клеточная культура)
HPV-77.DE5	M33	1966	США	77 п. – AGMK 5 п. – утиные эмбрионы
HPV-77 DK12	M33	1966	США	77 п. – AGMK 5 п. – клетки почки собаки
Cendehill	-	1967	Бельгия	3 п. – VMK 51 п. - RK-13
RA27/3	-	1965	США	4 п. – НЕК 17-25 п. WI-38
TO-336 vaccine	TO-336 gmk5	1967	Япония	7 п. - VMK 20 п. – первичные клетки почки морской свинки 3 п. – RK
TCRB19 vaccine	-	1967	Япония	1 п. – VMK 53 п. – клетки почки крупного рогатого скота 3 п. – RK
Matsuura vaccine (MEQ11)	Matsuura.B3	1966	Япония	14 п. – VMK 65 п. – клетки амнионов куриных эмбрионов 11 п. – фибробласты перепелиных эмбрионов
Matsuba vaccine (SK)	Matsuba.GMK3	1969	Япония	1 п. – VMK 60 п. – клетки почки свиньи 6 п. – RK
Takahashi vaccine (KRT)	Takahashi RVi/Matsue. JPN/68	1968	Япония	4 п. – VMK 36 п. – первичные клетки тестикул кролика 1 п. – RK
BRD-2	BRD-1 (2BS)	1980	Китай	30 п. диплоидные клетки человека

VMK – клетки почки верветки; RK – клетки почки кролика; AGMK - клетки почки африканской зеленой мартышки; НЕК – эмбриональные клетки почки человека.

Для получения штамма Matsuura vaccine вирус пассировали не только на клетках млекопитающих, но и птиц: проводили 14 пассажей на клетках VMK, 65 пассажей на культуре клеток амниона куриных эмбрионов и 11 пассажей на перепелиных эмбриональных фибробластах [404]. Вероятно, именно с культивированием родительского штамма в клетках птиц (филогенетически отдаленных от человека хозяев) связано большее количество



аминокислотных замен у штамма *Matsuura vaccine*. Дополнительным селективным фактором было пассирование вируса в культуре клеток при пониженной температуре, что создавало необходимость адаптации вируса не только к новому хозяину, но и к пониженной температуре. При анализе мутаций, возникших в процессе аттенуации, важно дифференцировать мутации, являющиеся случайными, и те, которые отвечают за адаптацию к новому хозяину и к росту при пониженной температуре [406].

О молекулярных механизмах аттенуации вакцинных штаммов вируса краснухи известно немного. Сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей вакцинного и родительского штамма дает важную информацию для понимания молекулярных основ процесса аттенуации вируса краснухи. Несмотря на то, что детерминанты аттенуации вируса краснухи до сих пор точно не установлены, в ряде исследований были определены домены в геноме вируса краснухи, мутации в которых приводят к аттенуации вируса, а также выявлены точечные мутации, ведущие к изменению фенотипа вируса [406]. Методами «обратной генетики» были выявлены вероятные генетические детерминанты аттенуации и определён «минимальный генотип» вируса краснухи, необходимый для аттенуации. Обсуждается возможность в перспективе получить генетически-модифицированные штаммы вируса краснухи, сочетающие высокую иммуногенность, стабильность генотипа и фенотипа и минимальную реактогенность [405].

Результаты исследований разных групп ученых сходятся в том, что мутации, локализованные в генах, кодирующих неструктурные белки, и, в частности, протеазу, которая участвует в протеолитическом процессинге неструктурных белков, ведут к появлению холодоадаптированного фенотипа [405–409]. Сразу два японских научных коллектива выявили ряд мутаций в области ORF, кодирующей вирусную протеазу, ведущих к снижению репродукции вируса краснухи при повышенной температуре [405; 408; 409]. Особое внимание привлекает уникальные замены позиции 1042 протеазного домена полипротеина p150 [406]. У вакцинного штамма TCRB-19 в позиции 1042 находится аминокислота Cys, а у вакцинных штаммов Matsuba, Cendehill и KRT – His. Методами обратной генетики было доказано, что замена Tyr на His в позиции 1042 в геноме вакцинного штамма Takahashi vaccine сопровождалась появлением *ts* фенотипа [406]. При обратной замене His на Tyr в позиции 1042 генома штамма Takahashi vaccine наблюдался достоверный прирост в интенсивности репродукции при 39°C. Однако, при замене Tyr1042His в геноме дикого штамма-предка RVi/Matsue.JPN/68 наблюдалось лишь незначительное снижение репродукции вируса при 39°C, что свидетельствует о наличии дополнительных детерминант холодовой адаптации [408]. Дальнейшие исследования показали, что молекулярный клон дикого штамма RVi/Matsue.JPN/68 с заменой не только Tyr1042His, но и Thr1497Ile (домен хеликазы) обладал

сопоставимыми показателями роста с вакцинным штаммом Takahashi vaccine при температуре культивирования 39°C. Интенсивность репродукции данного клона была существенно ниже, чем у дикого штамма RVi/Matsue.JPN/68 и у клона с единственной заменой Tyr1042His [408].

Вместе с тем, нельзя исключать вклад в развитие аттенуационного фенотипа и других нуклеотидных замен, в том числе синонимичных. Совокупность таких как транс-, так и цис-действующих замен может способствовать репродукции вируса при пониженной температуре либо уменьшать стабильность вторичных структур генома при повышенной температуре и, как следствие, снижать эффективность вирусной репродукции [406; 408].

Замены в участке генома, кодирующем протеазу, обнаруженные у вакцинных штаммов, могут вызывать снижение активности вирусной протеазы при повышенной температуре культивирования, и, как следствие, снижать конформационную стабильность процессированных и неprocessированных неструктурных белков, что в результате может приводить к снижению репродукции вируса при повышенной температуре [406; 408]. Важно отметить, что продукты процессинга протеазой полипротеина p200 (неструктурные белки p150 и p90) необходимы для синтеза полноразмерной РНК негативной полярности, являющейся в свою очередь матрицей для синтеза геномной РНК. [410]. Протеаза вируса краснухи содержит богатый цистеином участок связывания ионов  $Ca^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ , которые являются кофакторами протеазной активности вируса [409]. Данный участок также содержит домен присоединения кальций-связывающего белка кальмодулина, опосредующего протеазную активность [411]. Возможной причиной приобретения *ts* фенотипа ряда вакцинных штаммов являются мутации в этом домене, которые приводят к изменению его конформации при высокой температуре и снижению активности протеазы [406; 411].

### **1.3.3 Подходы к разработке и потенциал клинического применения живых аттенуированных вакцин против COVID-19**

Для специфической профилактики COVID-19 применяются инактивированные, векторные, субъединичные, мРНК-вакцины, которые в многочисленных исследованиях показали высокую эффективность против гомологичного заражения (т.е. заражения вариантом вируса, на основе которого разработана вакцина) [412]. Массовое применение вакцин в период пандемии позволило снизить смертность от новой коронавирусной инфекции и заболеваемость тяжелыми формами COVID-19 [412; 413], что позволяет отнести это заболевание к потенциально вакциноуправляемым. Появление и широкое распространение новых эпидемически значимых вариантов SARS-CoV-2, в особенности варианта Omicron, значительно снизило эффективность вакцинопрофилактики COVID-19 [292; 294; 412]. Для поддержания эффективности вакцинации

на высоком уровне необходимо своевременно оптимизировать состав существующих вакцин в соответствии с актуальным набором циркулирующих вариантов SARS-CoV-2 [414].

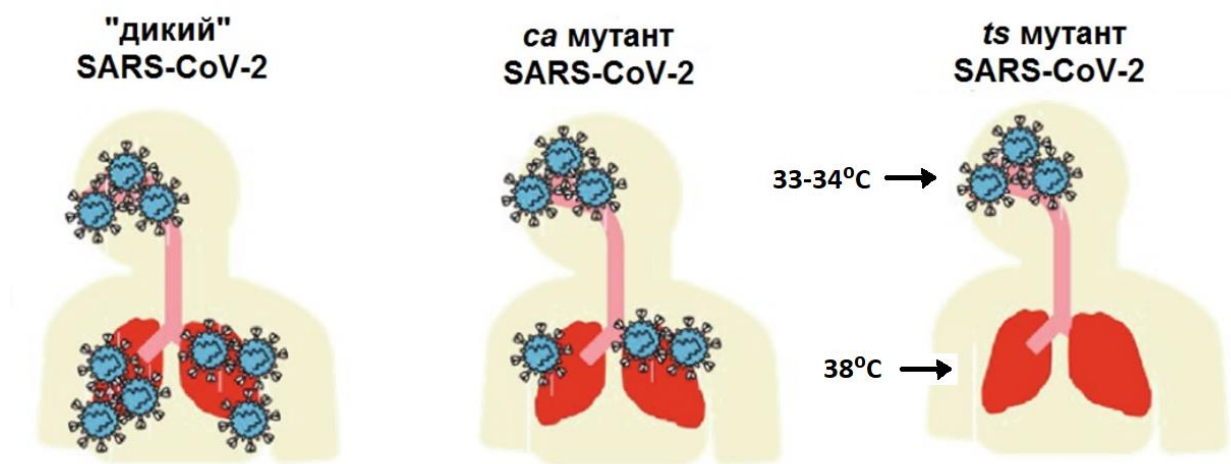
Возможным альтернативным подходом к решению данной проблемы является создание «универсальной» вакцины, обладающей перекрестной протективной активностью в отношении разных антигенных вариантов вируса. В частности, представляет интерес разработка живой аттенуированной вакцины, способной активировать не только гуморальное, но и клеточное звено иммунитета, обеспечивая стойкий иммунный ответ и перекрестную защиту от разных вариантов вируса [415; 416]. На протяжении более чем полувека ЖАВ успешно применяются для специфической профилактики вирусных заболеваний. Вакцины против полиомиелита, кори, краснухи, ветряной оспы, эпидемического паротита, ротавирусного энтерита и гриппа основаны на аттенуированных штаммах возбудителей этих заболеваний [14]. Получение вакцинных штаммов при разработке этих вакцин проводилось путем аттенуации дикого вируса путем длительного пассирования в культуре клеток в селективных условиях с образованием мутантных форм вируса. Аттенуация вакцинных штаммов проявлялась в снижении репродуктивной активности в клетках человека в результате адаптации к клеткам другого хозяина, либо в приобретении *sa* и/или *ts* фенотипа, ограничивающего размножение вируса при физиологической температуре человека [13; 14].

Через четыре года с начала пандемии потенциал ЖАВ в профилактике COVID-19 остается нереализованным. Вместе с тем, в ряде стран мира проводятся научные исследования, направленные на разработку и обоснование эффективности ЖАВ против COVID-19. В научной литературе описан опыт получения аттенуированных штаммов SARS-CoV-2, где для аттенуации вируса применяются различные подходы. Ряд авторов для аттенуации вируса используют традиционные подходы, направленные на получение *sa* мутантов вируса путём длительного пассирования в культуре клеток при пониженной температуре [417–420]. Другие используют методы генной инженерии и обратной генетики, позволяющие целенаправленно изменять геном вируса для получения его авирулентных вариантов [83; 84; 421–424]. Единственной ЖАВ против COVID-19, проходящей клинические испытания, является вакцина CoviLiv, ранее известная как Covi-Vac, - совместная разработка компании Codagenix (США) и Института сыворотки Индии. CoviLiv представляет собой вирус, у которого деоптимизированы кодоны в S-гене [13; 314; 425; 426].

#### ***Аттенуация SARS-CoV-2 традиционными методами***

Одним из классических подходов к аттенуации вирусов является их адаптация к выращиванию при пониженной температуре (*sa* фенотип), проводимая, как правило, в клетках другого хозяина. Так, в основе живых вакцин против гриппа, краснухи, кори лежат *sa* мутанты соответствующих вирусов [13; 314; 426; 427]. У вируса, адаптированного к росту в культуре

клеток при пониженной температуре, снижается репродуктивная активность при физиологической температуре 37<sup>0</sup>С или выше (*ts* фенотип), тогда как родительский штамм в этих условиях эффективно размножается. Наиболее важным для снижения вирулентности является то, что *ts* мутант вируса не способен эффективно размножаться и вызывать патологические изменения в легких и других внутренних органах, температура которых превышает 37<sup>0</sup>С (Рисунок 14). Если температура в легких у здорового человека превышает 37<sup>0</sup>С, то средняя температура головного мозга составляет 38,5<sup>0</sup>С [428], что снижает риск поражения не только легких, но и нейровирулентность респираторных вирусов, обладающих *ts* фенотипом.



«Дикий» вирус эффективно размножается в верхнем и нижнем отделе дыхательных путей. *Sa* мутант хорошо размножается в носоглотке, но медленнее «дикого» вируса размножается в лёгких. Вирус, обладающий *ts* фенотипом, размножается в носоглотке, но не способен эффективно размножаться в легких и вызывать пневмонию.

Рисунок 14 – Особенности размножения *sa* мутантов вируса *in vivo* (адаптировано по: Okamura S. и др., 2021 [429])

Представляет интерес опыт получения и клинического применения живых гриппозных вакцин, которые вводятся интраназально и активируют не только системный гуморальный и клеточный иммунитет, но и местный, мукозальный иммунитет во «входных воротах» инфекции - слизистой дыхательных путей. В основе ЖГВ лежит использование *sa* штамма - «донора» аттенуации, имеющего во «внутренних генах» мутации, которые определяют *sa* и *ts* фенотип вируса (способность размножаться при температуре 25<sup>0</sup>С–33<sup>0</sup>С, но не при 37<sup>0</sup>С–39<sup>0</sup>С) [430]. Таким образом, *sa/ts* штаммы вируса гриппа при интраназальном введении заражают верхние отделы дыхательных путей (это определяет их иммуногенность), но не способны размножаться в легких и вызывать пневмонию. Вакцинные штаммы для ЖГВ получают путём реассортации донорского штамма с актуальными эпидемическими штаммами, в результате которой штаммы-реассортанты несут «внутренние гены», определяющие их *att* фенотип, и гены гемагглютинаина

и нейраминидазы, ответственные за протективные свойства вируса [13; 314; 430]. С учетом существующего опыта создания и клинического применения ЖГВ, в настоящее время разрабатываются ЖАВ против COVID-19.

Для аттенуации SARS-CoV-2 в ряде работ вирус адаптировали к росту при пониженной температуре с одновременной сменой хозяина (Таблица 4) [417–420], тогда как в работе Li X.-F. с соавт. аттенуация достигнута путём только смены хозяина [431]. Изоляцию и дальнейшее культивирование вируса производили, как правило, в культуре клеток почки обезьяны (линия Vero CCL-81 или Vero E6). Для получения *sa* штаммов дикий (родительский) штамм пассировали при постепенно понижаемой до 21-25<sup>0</sup>С температуре. При достижении желаемой температуры проводили еще нескольких пассажей *sa* вируса при пониженной температуре для закрепления фенотипа и клонировали вирус методом бляшек [420], либо методом предельных разведений [418; 419]. У случайным образом отобранных *sa* клонов определяли наличие *ts* фенотипа [419; 420], поскольку *ts* фенотип является наиболее вероятным маркером аттенуации вируса [13].

Впервые получение аттенуированного вируса SARS-CoV-2 путем холодовой адаптации описали южнокорейские вирусологи Seo S., и Jang Y. еще в 2020 г. [419]. Адаптированный к выращиванию в культуре клеток Vero при температуре 22<sup>0</sup>С штамм CoV-2-CNUHV03-CA22<sup>0</sup>С отличался наличием как *sa*, так и *ts* фенотипа, что было ассоциировано с появлением 59 мутаций в геноме вируса, включая 37 несинонимичных замен. Иммунизированные *sa* вирусом трансгенные мыши линии K18-hACE2, несущие ген ACE2 рецептора человека, после экспериментального заражения родительским штаммом SARS-CoV-2 не только не погибали, но и не проявляли клинических признаков заболевания, тогда как все животные контрольной группы погибли от вирусной пневмонии и энцефалита. *Att* фенотип *sa* вируса проявлялся отсутствием выраженной гистопатологии в легких мышей и сниженной репродукцией вируса во внутренних органах по сравнению с диким вирусом на 6 сутки п.и.

В Институте Пастера (Тегеран, Иран) был также получен *sa/att* мутант SARS-CoV-2 (штамм KaraVac), способный размножаться в клетках Vero при температурах 25<sup>0</sup>С, 33<sup>0</sup>С и 39<sup>0</sup>С, но не при 41<sup>0</sup>С. Авторы предположили, что аттенуацию штамма KaraVac определяют две делеции в S-белке – одна в сайте расщепления S-белка, на стыке S1/S2 (мотив PRRA), вторая в сайте S1-NTD (мотив GTNGTKR). Иммунизированные штаммом KaraVac сирийские хомячки по сравнению с контрольной группой, заражённой диким штаммом, не теряли в весе и не проявляли других признаков заболевания [417].

Таблица 4 - Традиционные подходы к аттенуации SARS-CoV-2 (адаптировано по: Корчевая Е.Р. и др., 2023 [432])

№ пп	Название штамма	Стратегия аттенуации	Проявление <i>att</i> фенотипа на животной модели	Источник, год, страна
1	CoV-2-CNUHV03-CA22 <sup>0</sup> C	Холодовая адаптация в культуре клеток Vero до 22 <sup>0</sup> C.	Мыши линии K18-hACE2 не теряют в весе и не погибают, вирус хуже размножается в легких. Гистопатология лёгких не выраженная.	[419], 2020 Южная Корея
2	D-D2 и D-B4	Холодовая адаптация в культуре клеток Vero до 23 <sup>0</sup> C.	Сирийские хомячки не снижают аппетита, не проявляют вялости, сонливости, не замедляет прирост в весе. Вирус хуже размножается в легких и мозге по сравнению с диким штаммом.	[418], 2022, Россия
3	KaraVac	Холодовая адаптация в культуре клеток Vero до 25 <sup>0</sup> C.	Сирийские хомячки не теряют в весе по сравнению с контролем. Патологические изменения в лёгких отсутствуют.	[417], 2022, Иран
4	VAS5	Длительное пассирование в культуре клеток Vero.	Мыши линии K18-hACE2 не теряют в весе, патологические изменения в лёгких отсутствуют, в лёгких обнаруживаются лишь следовые количества РНК. У сирийских хомячков обнаруживается незначительное количество вирусной РНК в носовых ходах и лёгких.	[431], 2022, КНР
5	TS11	Холодовая адаптация в культуре клеток Vero E6 до 21 <sup>0</sup> C.	Сирийские хомячки не теряют в весе и не демонстрируют признаков заболевания, температура тела не повышается.	[420], 2023, США

В университете штата Огайо (Колумбус, США) получены *sa* мутанты SARS-CoV-2, адаптированные к росту в культуре клеток Vero E6 при температуре 21°C. Для дальнейшей работы был выбран клон TS11, обладающий *sa* и *ts* фенотипам, который отличался от родительского штамма делецией в 12 аминокислот в сайте расщепления S-белка фурином, и делецией размером в 371 нуклеотид, захватывающей гены ORF7b-ORF8, а также несколькими точечными мутациями в генах *nsp16*, *S*, *E*, *orf7a* и *N*. При интраназальном заражении клоном TS11 сирийские хомячки продолжали набирать вес и не проявляли признаков заболевания. TS11 хорошо размножался в полости носа, но не в легких, вызывая в них лишь незначительные поражения. К 20-му дню п.и. при гистологическом исследовании следов воспаления в легких не обнаруживалось [420].

В Пекинском институте микробиологии и эпидемиологии Академии военно-медицинских наук аттенуированный мутант SARS-CoV-2 был получен путем проведения серийных пассажей на культуре клеток Vero при температуре 37°C. Аттенуированный штамм VAS5 имел делецию в 7 аминокислот перед сайтом расщепления S1/S2 S-белка и значительно медленнее, чем «дикий» штамм, размножался в культурах клеток человека Caco-2 и Huh7 и первичных клетках лёгочного эпителия. Иммунизированные мыши линии K18-hACE2 при экспериментальном заражении аттенуированным штаммом не теряли в весе, не проявляли патологических изменений в лёгких, что согласовывалось с низким содержанием вирусной РНК в гомогенатах лёгких [431].

#### ***Аттенуация SARS-CoV-2 генно-инженерными методами***

Получение аттенуированного вируса классическими вирусологическими методами требует длительного пассирования вируса и может занять несколько месяцев, тогда как в условиях пандемии критически важно разработать вакцину максимально быстро [432]. С развитием методов обратной генетики появилась возможность быстрого создания вакцинных штаммов путем сайт-направленного мутагенеза [433–435], деоптимизации кодонов [17] или других подходов. Для реализации этой возможности требуется глубокое знание роли тех или иных генетических элементов вируса в патогенезе заболевания, установление факторов и детерминант вирулентности вирусов. Получение вакцинного штамма требует не только глубоких знаний биологии возбудителя, его антигенного разнообразия и взаимоотношений с хозяином, но и тщательных доказательств его безопасности, стабильности *att* генотипа и фенотипа. На первоначальных этапах исследований недостаток сведений о новом для человека возбудителе SARS-CoV-2 компенсировался знаниями о других хорошо изученных коронавирусах человека и животных. Так, на вирусе гепатита мышей (вид *Betacoronavirus muris*, известный как *Murine hepatitis virus*), хорошо изученном модельном коронавирусе, было показано, что высококонсервативные для различных коронавирусов гены неструктурных белков NSP14 и NSP16 являются универсальными мишенями для мутагенеза с целью снижения

вирулентности вируса. Внесение даже единичных аминокислотных замен в эти белки обеспечивало появление у вируса *att* фенотипа для мышей. При этом мутантный аттенуированный вирус оставался высокоиммуногенным для мышей и обеспечивал эффективную защиту от заражения летальной дозой вируса [436].

В работе, выполненной в Гонконгском университете науки и технологии (Китай), в качестве мишени также использовали NSP16 SARS-CoV-2, внося в него мутацию D130A. Белок NSP16 является антагонистом интерферонов типа I и критически важен для метилирования 5'-кэп структуры вирусных мРНК, а точечная мутация D130A инактивирует метилтрансферазную активность NSP16. Снижение вирулентности мутантного штамма d16 продемонстрировано путем заражения сирийских хомячков и мышей линии K18-hACE2, которые не теряли в весе и не проявляли признаков заболевания [424]. Путем длительного пассирования штамма d16 в культуре клеток Vero E6 показано отсутствие признаков реверсии вирулентности, что свидетельствует о стабильности его *att* фенотипа.

Вирусологи Техасского университета (Галвестон, США) использовали в качестве мишени гены акцессорных белков SARS-CoV-2 ORF3, ORF6, ORF7 и ORF8, поскольку они связаны с регуляцией репродукции вируса в зараженных клетках. Из вирусного генома были удалены гены акцессорных белков; кроме того, регуляторная транскрипционная последовательность TRS ACGAAC была заменена на CCGGAT. Аттенуированный таким образом мутант Δ3678 хуже размножался в первичной культуре клеток эпителия лёгких человека по сравнению с родительским штаммом, но сохранял способность к репродукции в культуре клеток Vero E6. Авторы показали, что делеция ORF3 (Δ3a) сыграла важнейшую роль в аттенуации вируса Δ3678. При интраназальной иммунизации штаммом Δ3678 сирийские хомячки не теряли в весе, а вирусная нагрузка в смывах из дыхательных путей была значительно ниже, чем у контрольной группы, заражённой диким штаммом. На летальной модели коронавирусной инфекции мыши линии K18-hACE2 после иммунизации также не теряли в весе и не погибали даже при введении высокой дозы вируса Δ3678 [422].

В отделе вирусных препаратов FDA (США) с целью аттенуации геном SARS-CoV-2 (изолят WA1/2020) модифицировали следующим образом: удалили последовательность, кодирующую пептид PRRA перед сайтом расщепления фурина, удалили гены ORF6-ORF8, и внесли замены K164A и H165A в С-концевой домен белка NSP1. Полученный штамм WA1-ΔPRRA-ΔORF6-8-Nsp1<sup>N128S/K129E</sup> хуже чем исходный вирус размножался в культуре клеток эпителия трахеи и бронхов человека MatTek EpiAirway и при заражении трансгенных мышей K18-hACE2 и сирийских хомячков вызывал у них лишь слабовыраженные поражения лёгких [421].

В Осацком университете (Япония) методами обратной генетики получили библиотеку из 659 мутантных клонов на основе клинического изолята SARS-CoV-2 линии B.1.1 (Pango). Далее,



путем культивирования клонов в двух температурных режимах 32°C и 37°C отбирали для дальнейшей работы *ts* клоны, которые не вызывали ЦПД при 37°C. Экспериментальное заражение сирийских хомячков показало *att* фенотип отобранных *ts* мутантов, который проявлялся в отсутствии потери веса, снижении репродуктивной активности вируса респираторном тракте и менее выраженном воспалении легких по сравнению с исходным штаммом [84].

В исследовании, выполненном в Свободном университете Берлина (ФРГ), путем деоптимизации большей части генома SARS-CoV-2 было получено несколько аттенуированных мутантов вируса [437]. Выбранные для дальнейшей работы штаммы sCDP9 и sCDP10 медленнее родительского штамма размножались в культуре клеток Vero E6, оставаясь при этом генетически стабильными на протяжении 10 пассажей. При интраназальной иммунизации сирийские хомячки незначительно теряли в весе, но быстро его восстанавливали, не проявляли признаков заболевания, имели меньшие воспалительные изменения в легких [423].

На основе технологии деоптимизации кодонов компания Codagenix (США) совместно с Институтом сыворотки Индии разработали вакцину COVI-VAC [83]. Мишенью для деоптимизации кодонов служил S-ген. После иммунизации вакцинным штаммом сирийские хомячки не теряли в весе, при гистологическом исследовании лёгких на шестой день обнаружены лишь минимальные воспалительные изменения. Инфекционный вирус в лёгких хомячков определялся на пределе чувствительности метода, что свидетельствует о крайне низкой репродуктивной активности вакцинного штамма в легких [83].

В Таблице 5 кратко обобщен мировой опыт получения аттенуированных штаммов SARS-CoV-2 с применением методов обратной генетики.

Важно отметить, что одной из ключевых характеристик, определяющих безопасность клинического применения ЖАВ, является стабильность *att* фенотипа и генетических детерминант аттенуации вакцинного штамма, что гарантирует невозможность реверсии вирулентности. Проблема нестабильности *att* фенотипа вакцинных штаммов проявилась, например, в появлении циркулирующих вакцинородственных полиовирусов - ревертантов вакцинных штаммов оральной полиомиелитной вакцины. Вирулентность вакцинородственных полиовирусов может быть сопоставимой с вирулентностью диких штаммов полиовируса, поэтому в странах, избавившихся от циркуляции диких штаммов, переходят от применения оральной полиомиелитной вакцины к инактивированной [438]. Знание генетических маркеров и детерминант аттенуации является важным условием для разработки методов оценки стабильности *att* генотипа [242]. В экспериментах на вакцинном штамме вируса гриппа A/Leningrad/134/47/57 (донор аттенуации для ЖГВ) доказана возможность быстрого появления ревертантов вирусов гриппа при его культивировании в куриных эмбрионах при непермиссивной температуре (40°C) [439].

Таблица 5 - Подходы к аттенуации SARS-CoV-2 на основе методов обратной генетики (адаптировано по: Корчевая Е.Р. и др., 2023 [432])

№ пп	Название штамма	Стратегия аттенуации	Проявление <i>att</i> фенотипа на животной модели	Источник, год, страна
1.	sCPD9 и sCPD10	Деоптимизация кодонов в большей части генома.	Сирийские хомячки и хомячки Роборовского не теряют в весе, признаки заболевания отсутствуют.	[423], 2021, Германия-Швейцария
2.	COVI-VAC	Деоптимизация кодонов S-гена.	Сирийские хомячки не теряют в весе. В лёгких, обонятельных луковицах и мозге РНК и инфекционный вирус определяются на пределе чувствительности. Лёгочная патология незначительна.	[83], 2021, США
3.	d16	Замена D130A в белке NSP16.	Мыши линии K18-hACE2 и сирийские хомячки не теряют в весе, титр вируса в носовых смывах и лёгких на пределе чувствительности. K18-hACE2 не теряют в весе и не погибают, гистопатология лёгких незначительна.	[424], 2022, Гонконг-КНР
4.	Δ3678	Удаление ORF3, ORF6, ORF7 и ORF8, замена ACGAAC на CCGGAT в регуляторной транскрипционной последовательности.	Сирийские хомячки не теряют в весе, титр вируса в носовых и ротовых смывах, трахеях и лёгких значительно ниже, чем в контроле. Мыши линии K18-hACE2 практически не теряют в весе, не погибают. Гистопатология лёгких слабовыражена.	[422], 2022, США
5.	WA1-ΔPRRA-ΔORF6-8-Nsp1 <sup>K164A/H165A</sup>	Удаление генов ORF6- ORF8, удаление PRRA перед сайтом расщепления фурина S-белка, замены K164A/H165A в C-концевом домене NSP1.	Мыши линии K18-hACE2 теряют в весе и погибают на 8 день от энцефалита. Поражения лёгких незначительные, вирусная нагрузка в лёгких значительно ниже, чем в группе контроля. Хомячки не теряют в весе, РНК обнаруживается только в бронхиальном эпителии. Патологические изменения в лёгких незначительны.	[421] 2022, США
6.	rTS-all	Внесение случайных мутаций, отбор <i>ts</i> мутантов.	Сирийские хомячки не теряют в весе, патологические изменения в лёгких незначительные. Титр вируса в лёгких и носовых смывах значительно ниже, чем в группе контроля.	[84] 2022, Япония

При конструировании ЖАВ против COVID-19 проблема нестабильности *att* генотипа и фенотипа также требует решения. Один из подходов к повышению стабильности *att* фенотипа кандидатного вакцинного штамма SARS-CoV-2 реализован в работе Yoshida A. с соавт. [84]. В этом исследовании получено несколько *ts* мутантов, для каждого из которых установлены аминокислотные замены, детерминирующие *ts* фенотип, локализованные в nsp14 (248V плюс 416S), nsp3 (445F) и nsp16 (67I). Авторы методами генной инженерии объединили эти мутации в одном штамме (rTS-all), что минимизировало вероятность появления ревертантов [84]. Другим подходом к получению аттенуированных штаммов вирусов со стабильным *att* фенотипом является деоптимизация кодонов вирусного генома. Поскольку деоптимизация кодонов предполагает множество синонимичных нуклеотидных замен, для таких штаммов появление компенсаторных мутаций, приводящих к реверсии вирулентности, крайне маловероятно. Аттенуированные путем деоптимизации кодонов штаммы SARS-CoV-2, сохранившие при этом свою иммуногенность, получены в работах Wang Y. и Trimpert J. с соавт. [83; 423]. Удаление из генома SARS-CoV-2 участков, кодирующих факторы вирулентности, например, ORF3, ORF6, ORF7 и ORF8 (гены аксессуарных белков), также позволяет получить аттенуированный штамм со стабильным *att* фенотипом [421; 422].

#### ***Методические подходы к генетической модификации SARS-CoV-2***

Примером использования методов обратной генетики для разработки вакцин могут служить системы генетической модификации коронавирусов, в частности SARS-CoV-2 [440]. Для SARS-CoV-2 были разработаны несколько вариантов систем обратной генетики, подходящих для работы с ними в лабораториях, отвечающих требованиям 3-го либо 2-го уровня биобезопасности (BSL3 и BSL2, соответственно). Системы, позволяющие воспроизвести инфекцию вирулентного вируса реализуются в лабораториях уровня BSL3, тогда как с системами для воспроизведения инфекции аттенуированных штаммов SARS-CoV-2, либо вируса с делециями в жизненно важных для вирусной репродукции генах, возможно проведение работ в лабораториях уровня BSL2. Большой размер коронавирусного генома и наличие в нем токсичных для бактерий последовательностей требует применения специфических приемов при создании инфекционного клона вируса. Среди систем обратной генетики коронавирусов известно несколько экспериментальных подходов для получения рекомбинантных вирусов, включая (а) лигирование ДНК *in vitro* [441], (б) применение векторов на основе бактериальной искусственной хромосомы (bacterial artificial chromosome, BAC) [442], или (в) дрожжевой искусственной хромосомы (yeast artificial chromosome, YAC) [443], (г) система на основе кольцевой полимеразной реакции (circular polymerase extension reaction, CPER) [440; 444].

Каждая из этих систем имеет свои преимущества и недостатки. Мультиплазмидная система устраняет влияние токсичных для бактерий элементов в вирусном геноме, позволяет одновременно вводить несколько мутаций по всему геному. В то же время, отличается высокой трудоемкостью вследствие дополнительных этапов получения вирусной кДНК и РНК [440]. Бактериальная искусственная хромосома позволяет вводить в бактерии последовательности ДНК, соответствующие полному геному, сводя к минимуму их нестабильность, не требует сложных манипуляций при получении клона кДНК и проведения реакции транскрипции *in vitro*. Однако, высока вероятность токсичности или нестабильности генома при введении новых мутаций, и, если уникальные сайты рестрикции недоступны, то для мутагенеза может потребоваться несколько этапов клонирования [440]. Система на основе дрожжевой искусственной хромосомы представляют собой единую плазмидную систему и отличается высокой устойчивостью к токсичности или нестабильности генома, опосредованной вирусными элементами, отсутствием ограничений в отношении уникальных сайтов рестрикции для клонирования и мутагенеза и более высокой эффективностью сборки за счет рекомбинации гомологичных концов при клонировании. В то же время, требуется владение методами культивирования дрожжей и клонирования в дрожжевых плаزمиды, а для верификации вирусной кДНК обычно требуется полногеномное секвенирование [440]. Кольцевая полимеразная реакция упрощает манипуляции с ДНК, чем при работе с плазмиды и РНК, при этом отсутствуют проблемы с нестабильностью рекомбинантной ДНК в составе плазмиды. Однако, сохраняется риск появления нежелательных мутаций при проведении высокоточной ПЦР, а для заражения клеток путем трансфекции может потребоваться проведение дополнительных вирусных пассажей [440].

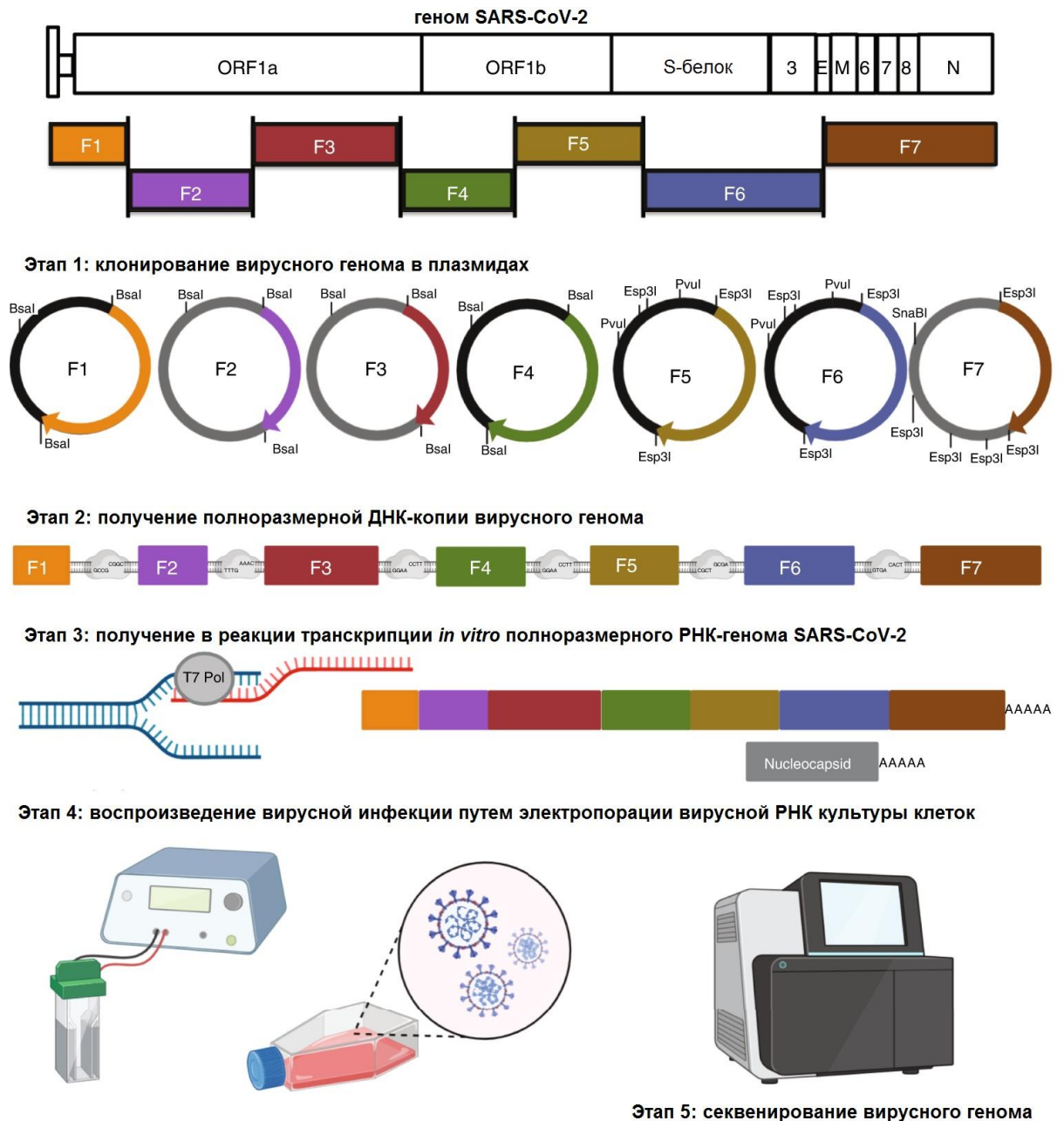
Коронавирусы обладают самым большим вирусным РНК-геномом - от 26,4 до 31,7 тысяч нуклеотидов [445; 446]. Как и у других вирусов с одноцепочечным РНК-геномом позитивной полярности, геном SARS-CoV-2 фланкирован 5'- и 3'-нетранслируемыми участками, которые содержат *cis*-действующие вторичные РНК-структуры, необходимые для синтеза РНК. Геном содержит 5'-«кэп» и 3'-поли-А хвост. С 5'-конца первые две трети вирусного генома кодируют открытые рамки считывания ORF1a и ORF1b, которые транслируются в два полипротеина (pp1a и pp1b). Эти два полипротеина далее процессируются двумя вирусными протеазами PLpro и Mpro в шестнадцать неструктурных белков Nsp1-Nsp16. Неструктурные белки образуют репликативный комплекс, в котором происходит синтез вирусной РНК. Следующий за ними 3'-концевой участок генома кодирует четыре структурных белка: оболочечные белки S, M и E и нуклеокапсидный белок N, несколько вспомогательных (аксессуарных) белков ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b и ORF8, а также потенциальные белки ORF3b и ORF9b [445; 447]. Структурные

белки входят в состав вириона, а вспомогательные белки модулируют реакцию хозяина, облегчая вирусную инфекцию и определяя патогенез [445; 448; 449].

Сборка полноразмерных кДНК клонов коронавируса остается сложной задачей из-за большого размера вирусного генома, присутствия токсичных для бактерий элементов и других факторов. До того, как были созданы полноразмерные инфекционные клоны кДНК, получение генно-модифицированных коронавирусов основывалось на стратегии целенаправленной рекомбинации РНК, которая основана на высокой эффективности рекомбинации гомологичной РНК в коронавиральном геноме [450]. Однако этот подход имеет ряд ограничений, в том числе не позволяет вводить мутации на всем протяжении вирусного генома, особенно в генах, связанных с репликацией или летальными мутациями [450].

За последние два десятилетия, с появлением современных молекулярных методов и реагентов (новые рестриктазы, высокоточная полимеразы, искусственные бактериальные и дрожжевые хромосомы), появились новые оригинальные подходы, включая широко применяемую систему, основанную на лигировании фрагментов ДНК *in vitro* [441; 451–453]. Стратегия, основанная на лигировании *in vitro*, заключается в сборке *in vitro* полноразмерной ДНК-копии вирусного генома из нескольких фрагментов двуцепочечной ДНК, которая в дальнейшем используется в качестве матрицы для синтеза вирусной РНК с использованием фаговой ДНК-зависимой РНК-полимеразы (например, T7 или SP6 РНК-полимеразы). Отдельные фрагменты кДНК могут быть получены с помощью химического синтеза, высокоточной ПЦР или в плазидах, клонированных в клетках *E. coli*. Исключив стадию размножения полноразмерной кДНК в бактериях, можно свести к минимуму токсичность генов и получить аутентичные вирусные последовательности. Впервые этот подход был реализован Rice С.М. с соавт. для получения рекомбинантного вируса желтой лихорадки [454]. С тех пор метод, основанный на лигировании *in vitro*, широко использовался для получения полноразмерных инфекционных клонов других РНК-вирусов, включая коронавирусы [440; 452; 455].

Начало пандемии COVID-19 послужило толчком к разработке систем обратной генетики SARS-CoV-2. На Рисунке 15 схематично изображен принцип получения инфекционного молекулярного клона SARS-CoV-2 путём сборки полноразмерной ДНК-копии вирусного генома с помощью ДНК-лигазы [440; 456].



Полная копия генома SARS-CoV-2 представлена в виде 7 фрагментов генома в составе 7 плазмид, фланкированных уникальными сайтами рестрикции. Полноразмерную кДНК SARS-CoV-2 собирают путем последовательного лигирования *in vitro* фрагментов вирусного генома, вырезанных специфическими эндонуклеазами из плазмид. Полноразмерная вирусная геномная кДНК находится под контролем промотором фага T7 на 5'-конце и кодирует поли(A)-хвост на 3'-конце. На основе полноразмерной кДНК проводится реакция транскрипции *in vitro* с получением геномной РНК, которой методом электропорации трансфецируются клетки Vero, что инициирует инфекционный процесс с получением рекомбинантного SARS-CoV-2.

Рисунок 15 - Сборка полноразмерного кДНК клона и воспроизведение инфекции SARS-CoV-2 (адаптировано по: Kurhade C. и др., 2023; Xie X. и др., 2021 [440; 456])

Семь последовательных фрагментов ДНК, охватывающих весь геном SARS-CoV-2, получают с помощью обратной транскрипции с последующей ПЦР на основе вирусного генома или путем химического синтеза и встраивают в плазмиды. Фрагменты вирусного генома

фланкируют две эндонуклеазы рестрикции класса IIS - BsaI или Esp3I, способные распознавать асимметричные последовательности ДНК, расщеплять ДНК вне сайта распознавания с образованием уникальных «липких» концов, которые обеспечивают однонаправленную сборку семи фрагментов с сопутствующим удалением сайтов рестрикции. На 5' и 3' концах вирусного генома встраивается промотор фага T7 и поли(А)-хвост из 29 оснований.

Лигированную полноразмерную кДНК используют в качестве матрицы для транскрипции *in vitro* РНК-полимеразой фага T7 с получением 5'-кэпированной и 3'-полиаденилированной полноразмерной РНК. Электропорация этих РНК-транскриптов в чувствительные для вируса клетки Vero приводит к получению рекомбинантного SARS-CoV-2. В ранних работах для повышения эффективности воспроизведения коронавирусной инфекции часто использовалась электропорация с мРНК, кодирующей синтез нуклеопротеина SARS-CoV-1 [452; 457; 458].

«Лигазная» система получения инфекционного молекулярного клона позволила исследовать роль мутаций в S-белке [422; 459–462], нуклеокапсиде [463] и вспомогательных белках SARS-CoV-2 [448]. Кроме того, эта система была использована для получения адаптированного к мышам SARS-CoV-2 и моделирования коронавирусной инфекции *in vivo* [464]. Кроме того, получены генетически-модифицированные штаммы SARS-CoV-2 с репортерным геном флуоресцентного белка (например, ген зеленого флуоресцентного белка) или геном люциферазы, встроенным вместо ORF7 [441; 456; 465], которые широко применялись для изучения нейтрализующей активности сывороток вакцинированных лиц или реконвалесцентов COVID-19 [466–469] и *in vitro* скрининга противовирусных препаратов [465]. Так, применение рекомбинантного штамма SARS-CoV-2 с геном люциферазы позволило обнаружить несколько моноклональных антител, нейтрализующих геноварианты SARS-CoV-2 повышенной эпидемиологической значимости [470–473] и выявить противовирусную активность таких наиболее эффективных ингибиторов вирусной репродукции, как хлорохин, ремдесивир, нелфинавир, рупинтравир и кобицистат [441].

### ***Иммуногенный потенциал ЖАВ против COVID-19***

Все лицензированные вакцины против COVID-19 (инактивированные, векторные, рекомбинантные, мРНК-вакцины) не обладают инфекционной активностью. Для большинства из них протективная активность преимущественно обусловлена активацией гуморального звена иммунитета и основана на синтезе вируснейтрализующих антител. В связи с этим, вакцины первого поколения не способны обеспечить формирование стерилизующего и полноценного мукозального иммунитета [266]. Кроме того, поскольку первые вакцины основаны на ранних геновариантах вируса, филогенетически близких родоначальному Уханьскому вирусу, данная мишень обладает высокой изменчивостью под влиянием давления, возникающего на фоне активного эпидемического процесса и массовой иммунизации. В результате эффективность

вакцинации против вновь возникающих вариантов SARS-CoV-2 снижается [292; 294]. В связи с высокой изменчивостью S-белка, представляют интерес вакцины, имеющие в своем составе более консервативный протективный антиген SARS-CoV-2 - нуклеопротеин (NP) [474; 475].

В основе более высокой эффективности ЖАВ с интраназальным способом введения лежат те же механизмы, которые участвуют в формировании врожденного и приобретенного иммунитета при естественном заражении респираторным вирусом [476; 477]. Вакцинный штамм вируса, обладающий *ts* фенотипом, заражает клетки верхнего отдела дыхательных путей, а лимфоидные ткани, ассоциированные со слизистой оболочкой респираторного тракта, становятся первой линией защиты против вирусной инфекции [432]. В этот процесс вовлекаются все компоненты врожденного иммунитета верхних дыхательных путей - как клеточные (нейтрофилы, макрофаги, дендритные клетки, резидентные микроскладчатые М-клетки, врожденные лимфоидные клетки (*Innate Lymphoid Cells*), естественные киллеры и тучные клетки), так и растворимые молекулы (галектины, коллектины, цитокины и др.). После запуска первой линии защиты происходит активация в очаге инфекции дендритных клеток, которые поглощают, процессируют и презентуют вирусные антигены, мигрируют в регионарные лимфатические узлы, где происходит презентация антигенов неактивированным Т-клеткам, что запускает их дальнейшую дифференцировку и активацию адаптивного иммунитета с формированием цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-хелперов [432]. Специфические неактивированные В-лимфоциты распознают вирусные антигены либо самостоятельно, либо при их презентации фолликулярными дендритными клетками в виде комплекса антиген/антитело посредством Fc-рецептора. Взаимодействие активированных Т-хелперов и В-лимфоцитов приводит к запуску гуморального иммунного ответа. Именно одновременная экспансия CD4<sup>+</sup> Т-хелперов, CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-клеток в очаге инфекции и продукция антител плазматическими клетками имеет решающее значение для элиминации вируса [432]. Сочетанная активация гуморального и клеточного звеньев системной и мукозальной (местной) иммунной защиты способна обеспечивать эффективную защиту от инфекции SARS-CoV-2 [478; 479]. Важным фактором эффективности ЖАВ является то, что иммунный ответ формируется против всех вирусных белков, как структурных, так и неструктурных. Так, структурные белки М и N являются высокоиммуногенными и, вместе с неструктурными белками, являются более консервативными, чем S-белок. Кроме того, многие Т-клеточные эпитопы филогенетически родственных видов коронавируса и различных геновариантов SARS-CoV-2 располагаются не только в S-белке [480; 481]. Нужно также отметить, что протективность Т-клеточного иммунитета меньше зависит от мутаций, определяющих формирование новых эпидемически значимых вариантов SARS-CoV-2, поскольку он нацелен на более консервативные вирусные антигены [482; 483].



В медицинской практике применяются разные способы введения ЖАВ - вакцины против кори, краснухи, эпидемического паротита и ветряной оспы вводятся внутримышечно, оральная полиомиелитная вакцина и ротавирусная вакцина - перорально, ЖГВ - интраназально. Примечательно, что большинство разработчиков ЖАВ против COVID-19 ориентированы на исследование эффективности интраназального способа введения [83; 84; 417–424]. Интраназальное или пероральное введение вакцины сопровождается заражением клеток слизистой оболочки во входных воротах инфекции, благодаря чему обеспечивается формирование мукозального (местного) иммунитета, включая секрецию IgA в просвет дыхательных путей или кишечника. При заражении вирулентным штаммом специфические секреторные IgA нейтрализуют вирус непосредственно во входных воротах инфекции, подавляя его адгезионную способность. Более того, сформировавшийся мукозальный иммунитет снижает эффективность трансмиссии вируса при естественном заражении [484].

Высокая эффективность живых мукозальных вакцин определяется размножением аттенуированного вируса в организме человека, поэтому при разработке живых вакцин большое внимание уделяется их безопасности. При интраназальном введении недостаточно аттенуированного вируса существуют риски поражения центральной нервной системы через обонятельные нервы [485]. При внутримышечном введении ЖАВ риск поражения мозга минимален, при этом уровень сероконверсии после второй иммунизации достигает 95-100% [486; 487].

Аттенуация, иммуногенность и протективная активность экспериментальных живых вакцин исследована на животных моделях коронавирусной инфекции, основанных на золотистых сирийских хомячках и трансгенных мышах линии K18-hACE2. В большинстве работ у иммунизированных животных наблюдалось развитие протективного иммунного ответа в отношении родительского штамма SARS-CoV-2, использованного для аттенуации. Иммунизированные аттенуированными мутантами вируса сирийские хомячки при экспериментальном заражении «диким» штаммом не теряли в весе, не проявляли клинических признаков заболевания, при этом вирус имел более низкую репродуктивную активность как в верхних, так и в нижних отделах респираторного тракта по сравнению с контрольной группой [84; 417; 418; 422]. Trimpert J. с соавт. отметили формирование у иммунизированных животных стерильного иммунитета, поскольку вирус после экспериментального заражения не выделялся в культуре клеток из гомогенатов легких [423; 488]. Xu J. с соавт. не обнаружили у иммунизированных *ts* мутантом хомячков никаких признаков заболевания, даже несмотря на случайное перекрёстное заражение диким штаммом от животных группы контроля [420]. Liu Y. с соавт. установили, что однократная интраназальная иммунизация сирийских хомячков аттенуированным мутантом Δ3678 не только защищала их от пневмонии при заражении

вирулентным штаммом, но и снижала вероятность трансмиссии вируса [422]. Li X.-F. с соавт. целенаправленно оценивали вероятность трансмиссии вируса SARS-CoV-2 от иммунизированных животных, обнаружив крайне низкую вероятность передачи вируса неиммунным животным при тесном контакте с иммунизированными и заражёнными хомячками [431]. Seo S.H. и Jang Y. исследовали эффективность иммунизации *ca* вирусом на летальной модели COVID-19 - мышях линии K18-hACE2. Иммунизированные мыши не только выжили при экспериментальном заражении, но и не теряли в весе, и не имели клинических признаков заболевания [419]. Однако, Liu S. с соавт. показали, что использование при моделировании COVID-19 мышей линии K18-hACE2 имеет ограничения при оценке безопасности и эффективности живых вакцин [421]. Заражение аттенуированным SARS-CoV-2 приводит к развитию у трансгенных мышей энцефалита с последующей гибелью животных, что затрудняет интерпретацию результатов. Для оценки эффективности иммунизации авторам приходилось оценивать вирусную нагрузку в образцах носовых ходов, лёгких и мозга на разные сроки после заражения. Любопытно, что даже максимально аттенуированный штамм WA1-ΔPRRA-ΔORF6-8-Nsp<sup>1N128S/K129E</sup> являлся нейротропным и определялся на высоком уровне в мозге мышей K18-hACE2 на шестой день после заражения [421].

Живые вакцины на основе аттенуированного SARS-CoV-2 имеют высокий потенциал перекрёстной протективной активности, о чем свидетельствуют наблюдения за частотой повторного инфицирования после ранее перенесённой инфекции. Так, естественно перенесённая инфекция SARS-CoV-2 предотвращала до 90% случаев реинфекции вариантами Alpha, Beta или Дельта [489; 490] и 56% случаев реинфекции вариантом Omicron [491]. Большинство случаев реинфекции происходило спустя год после первичного заболевания, что в условиях пандемии косвенно отражает стойкость противовирусного иммунитета [491]. Реинфекция стала обычным явлением с момента появления варианта Omicron и дальнейшей его эволюции. Исследование, проведенное в Катаре, показало, что заражение человека вариантами SARS-CoV-2, предшествующими Omicron, обеспечивало менее 60% защиты от повторного заражения субвариантами Omicron. В то же время, защитная эффективность первичной инфекции от развития тяжелой формы заболевания или летального исхода при повторном заражении вариантом Omicron составила 97,3% (95% ДИ: 94,9-98,6%), независимо от варианта вируса, вызвавшего первичную инфекцию [492]. Чрезвычайно низкая доля тяжелых и летальных случаев при повторном заражении вселяет надежду на то, что ЖАВ против COVID-19 смогут обеспечить перекрестную защиту от различных вариантов вируса.

Экспериментальное подтверждение перекрёстной защиты при иммунизации модельных животных аттенуированными штаммами SARS-CoV-2 получено в двух независимых исследованиях. В работе Trimpert J. с соавт. после иммунизации аттенуированным Ухань-

подобным штаммом хомячков Роборовского заражали циркулировавшими на момент постановки эксперимента вариантами вируса Alpha и Beta. Однократной интраназальной иммунизации оказалось достаточно для возникновения защиты не только против родительского штамма вируса, но и против вариантов Alpha и Beta [488]. В работе Yoshida A. с соавт. хомячков, иммунизированных интраназально аттенуированным и родительским штаммами SARS-CoV-2 линии B.1.1 (Ухань-подобный), заражали вариантом Omicron (линия BA.1). В носовых смывах и гомогенатах лёгких у иммунизированных хомячков инфекционный вирус определялся на пределе чувствительности метода независимо от выбранного для иммунизации штамма, что было проявлением протективного перекрестного иммунного ответа [84].

Защита от гетерологичного заражения может не сопровождаться высокой нейтрализующей активностью сывороток крови иммунизированных животных в отношении гетерологичного штамма. Так, в работе Ma J. с соавт. при иммунизации хомячков дикими штаммами вариантов Beta и Omicron (линии BA.1) и последующим заражением Ухань-подобным, Beta, Дельта и Omicron BA.1 вариантами отмечена слабая нейтрализующая активность антител при заражении гетерологичными штаммами, при этом заражение гетерологичными по отношению к Omicron штаммами хомячков, ранее инфицированных Omicron, оказало бустерный эффект на синтез нейтрализующих антител [493]. Таким образом, по мнению авторов, двукратное заражение гетерологичными штаммами обеспечивает выраженный противовирусный иммунный ответ, что следует учитывать при разработке схем вакцинации.

Данные о безопасности и эффективности ЖАВ против COVID-19 для людей практически отсутствуют. По данным ВОЗ живая аттенуированная вакцина COVI-VAC (Codagenix, США) находится на 3 фазе клинических испытаний, однако официальный отчет о результатах испытаний на момент написания обзора литературы отсутствовал [494]. В то же время на официальном сайте разработчика вакцины уже есть анонс скорого появления такого отчета [495]. В нем отмечается, что ЖАВ против COVID-19 CoviLiv™ (новое название вакцины COVI-VAC) является иммуногенной, хорошо переносится здоровыми взрослыми, а также индуцирует формирование протективного клеточного иммунитета в отношении всех известных вариантов SARS-CoV-2. В испытаниях приняли участие 48 взрослых здоровых людей. В пресс-релизе компании говорится, что испытания вакцины являются частью программы ВОЗ «Объединяющие экспериментальные вакцины» (Solidarity Trial Vaccines), направленной на поддержку разработки вакцин против COVID-19 второго поколения, обладающих большей эффективностью в отношении новых эпидемически-значимых вариантов, большей продолжительностью защиты, упрощенными условиями хранения и безыгольным способом введения [495].

Таким образом, широкое распространение «ускользающих» от вакцинации вариантов SARS-CoV-2 предопределило реализацию ряда научных исследований, направленных на разработку вакцин, эффективных в отношении широкого спектра антигенных вариантов вируса. Исследования, проведенные на животных моделях COVID-19, в большинстве своем показали безопасность и высокую эффективность интраназальной иммунизации животных аттенуированными вариантами SARS-CoV-2 независимо от избранной стратегии аттенуации вируса. В пилотных экспериментах на животных подтверждена гипотеза о протективной активности аттенуированных штаммов SARS-CoV-2 в отношении гетерологичных антигенных вариантов вируса. Важно отметить, что представленные в исследованиях данные о вирулентности и иммуногенности кандидатных вакцинных штаммов, полученные на животных моделях, невозможно экстраполировать на человека, без проведения клинических исследований. В то же время, накопленный на сегодняшний день опыт, в том числе обнадёживающие предварительные результаты начальных фаз клинических испытаний ЖАВ, показывают большой потенциал создания высокоэффективной живой аттенуированной вакцины против COVID-19.

Материалы разделов 1.2, 1.3.2 и 1.3.3 опубликованы в виде обзорных статей [188; 406; 432].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 МАТЕРИАЛЫ

#### 2.1.1. Лабораторные штаммы вирусов

Лабораторные штаммы вирусов, использованные в качестве положительных контрольных образцов при разработке лабораторной тест-системы для дифференциального выявления НК респираторных и кишечных вирусов, представлены в Таблице 6.

Таблица 6 - Лабораторные штаммы респираторных и кишечных вирусов

Вирус	Название штамма, тип	Источник
Вирус гриппа А	А/Соломоновы Острова/3/06(Н1N1), А/Калифорния/7/04(Н3N2), А/Техас/1/77(Н3N2), А/Брисбан/59/07(Н1N1), А/Брисбан/10/07(Н3N2), А/Москва/80/08(Н1N1), А/Владивосток/6/08(Н3N2), А/Panama/2007/99 (Н3N2), А/Ленинград/549/80 (Н2N2), А/PR/8/34 (Н1N1), А/Миссисипи/1/85 (Н3N2), А/Сингапур/1/57(Н2N2), А/Ленинград/134/57(Н2N2), А/Краснодар/101/59(Н2N2), А/Чили/1/83(Н1N1), А/Рязань/6103/86 (Н3N2)	Иванова В.Т. (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, входящий в состав ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, г. Москва).  А/Panama/2007/99 (Н3N2) и РСВ, штамм Long предоставлены Соминина А.А. (ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, г. Санкт-Петербург).
Вирус гриппа В	В/Малайзия/2506/04, В/Флорида/7/04, В/Владимир/25/08, В/Ленинград/179/86	
Респираторно-синцитиальный вирус	штамм Long	
Энтеровирусы	Эховирусы 3, 6, 7, 30 типов Коксаки В (не типирован); Полиовирусы 1, 2, 3 типов (вакцинные штаммы Сэбина)	Иванова О.Е. (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), г. Москва)
Вирусы парагриппа	ВПГ-1, ВПГ-4 (штамм ПГ-4В)	Доктор Claas E.C. (Медицинский центр Лейденского университета, Нидерланды)
	ВПГ-2, ВПГ-3	Соминина А.А. (ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, г. Санкт-Петербург).
Аденовирусы человека	АДВ 2, 3, 5, 7, 8 типа	АДВ 3, 7 и 8 типа - Соминина А.А. (ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, г. Санкт-Петербург). АДВ 2 и 5 типа –Борисенко А.С. (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, г. Москва)

## Продолжение Таблицы 6

Риновирусы	Rhinovirus A - 2, 14, 15, 16, 20, 59 типа Rhinovirus B - 14, 17 70, 72, 86 типа	Образцы риновирусной РНК предоставлены Макаровым В.А. (институт Биохимии им. А.Н. Баха, г. Москва). Риновирус А 16 типа получен из Гос. коллекции вирусов (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, г. Москва)
Коронавирусы	НCoV-229Е, НCoV-OC43	Образцы вирусной РНК предоставлены доктором Claas E.C. (Медицинский центр Лейденского университета, Нидерланды)
Вирус краснухи	Вакцинный штамм RA 27/3, штамм С-77	Десяткова Р.Г. (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, г. Москва)
Орторевовирус млекопитающих	Орторевовирусы 1 типа (штамм Lang), 2 типа (штамм Д-5, Jones), 3 типа (штамм Dearing)	Гос. коллекция вирусов, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, г. Москва)
Вирус гепатита А	Вакцинный штамм HAS-15	Кюрегян К.К. (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), г. Москва)
Ротавирусы группы А	Wa (G1P[8]), DS-1 (G2P[4])	American Type Culture Collection (ATCC), США

Лабораторные штаммы ротавирусов группы А, использованные при разработке тест-систем для генетической характеристики РВА, представлены в Таблице 7.

Таблица 7 - Лабораторные штаммы РВА, использованные при исследовании генетического разнообразия ротавирусов

Штамм РВА, генотип	Источник получения штамма	Номер в коллекции	Культура клеток
Wa, G1P[8]I1	АТСС, США	VR-2018	МА-104
DS-1, G2P[4]I2	АТСС, США	VR-2550	МА-104
568, G3P[3]I2	Гос. коллекция вирусов, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, г. Москва	2288	МА-104
HRV-248, G4P[4]I1	АТСС, США	VR-2274	МА-104
WI-61, G9P[8]I1	АТСС, США	VR-2551	МА-104

Лабораторные штаммы нового коронавируса, использованные в исследовании биологических и иммуногенных свойств *sa* мутантов SARS-CoV-2, представлены в Таблице 8.

Таблица 8 - Лабораторные штаммы SARS-CoV-2, использованные в исследовании

Название штамма (варианта)	Краткое название	<i>sa</i> фенотип*	<i>ts</i> фенотип*	Источник	GenBank ID, геновариант
Dubrovka	D	нет	нет	Изолирован от больного COVID-19 в июне 2020 г.	MW514307.1 B.1.1.317, Ухань-подобный
Dubrovka-37	D-37	нет	нет	42 пассажа штамма D в клетках Vero при 37°C	ON380441.1
Dubrovka-sa	D-sa	да	нет	42 пассажа в клетках Vero при температуре 37°C => 23°C	ON040960.1
Dubrovka-sa-B4	D-B4	да	нет	Получены в результате 3-х-кратного клонирования варианта D-sa	ON059701.1
Dubrovka-sa-D2	D-D2	да	да		ON040961.1
Podolsk	нет	нет	нет	Изолирован от больного COVID-19 в 2021 г.	ON032860.1 Delta, AY.122
Otradnoe	нет	нет	нет	Изолирован от больного COVID-19 в январе 2022 г.	ON032857.1Omicron, BA.1.1
FEB2	нет	нет	нет	Изолирован от больного COVID-19 в октябре 2022 г.	OP920753.1 Omicron, BA.5.2

\* способность размножаться в культуре клеток при 23°C

\*\* не способность размножаться в культуре клеток при 39°C

Для выявления маркеров аттенуации вируса краснухи использован отечественный штамм вируса краснухи С-77, выделенный Р.Г. Десятковой из назального смыва больного манифестной формой краснухи в 2001 г. [496]. Также в работе использовались два *sa* мутанта штамма С-77, полученные на 39 и 46 пассаже. *Sa* мутанты были получены ранее Р.Г. Десятковой путем длительного пассирования дикого варианта штамма С-77 в культуре клеток Vero: 34 пассажа при температуре 35°C, и дополнительные 4 и 11 пассажей при 33°C [496].

Для оптимизации условий выявления и количественного определения вируса краснухи методом ОТ-ПЦР-РВ были использованы препараты вакцинного штамма вируса краснухи Wistar RA 27/3, полученные из разных источников (Таблица 9).

Таблица 9 - Препараты вируса краснухи

Штамм	Источник	Описание
Wistar RA 27/3	МПБП ФГУП «НПО Микроген»	Вакцинный штамм, титр 3,8-4,0 lg ТЦД <sub>50</sub> /мл (тканевых цитотоксических доз вируса, вызывающих ЦПД в 50% лунок с чувствительной культурой клеток в 1 мл)

## Продолжение Таблицы 9

Wistar RA 27/3	National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Великобритания	Международный стандарт вируса краснухи (1 <sup>st</sup> International Reference Reagent for Rubella (Live), NIBSC Code 91/688, Version 03)
Wistar RA 27/3	Приобретён в аптеке	Вакцина против краснухи живая аттенуированная R-VAC™, лиофилизированный препарат вакцинного штамма вируса краснухи Wistar RA 27/3, Serum Institute of India; титр - не менее 3,0 lg ТЦД <sub>50</sub> /мл

### 2.1.2. Панели клинических образцов и изолятов вирусов

При апробации лабораторной тест-системы для дифференциального выявления НК респираторных вирусов на основе мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ было проанализировано 815 клинических образцов, собранных в период с 2007 по 2012 гг., разделенных на 5 панелей (P1, P2, P3, P4, P5), представленных назальными мазками или смывами от пациентов всех возрастов с симптомами ОРВИ, а также лиц без симптомов респираторной инфекции. Клинические образцы получены из различных лечебно-профилактических учреждений Москвы и Московской области – ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Московской области» Роспотребнадзора, г. Мытищи; детское инфекционное отделение МОНКИ им. Ф.М. Владимирского, г. Москва; Центр экологии и эпидемиологии гриппа (ЦЭЭГ) Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, входящий в состав ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, г. Москва; детское инфекционное отделение МУ «Дзержинская городская больница», г. Дзержинский; городские поликлиники №39 и №203 г. Москвы.

**Панель P1** (n=226) - мазки из полости носа от пациентов всех возрастов с симптомами ОРВИ, охарактеризованные методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ на наличие 12 респираторных вирусов – ВГрА, ВГрВ, ВПГ-1, ВПГ-2, ВПГ-3, ВПГ-4, РСВ, РВ, метапневмовируса, коронавирусов HCoV-NKU1, HCoV-NL63, HCoV-229E и HCoV-OC43 с помощью лабораторного образца набора реагентов, любезно предоставленного доктором Claas E. (Медицинский центр Лейденского университета, Нидерланды).

**Панель P2** (n=267) - зашифрованные клинические образцы (смывы из полости носа) от пациентов, госпитализированных с гриппоподобными симптомами, охарактеризованные на наличие ВГрА и ВГрВ культуральным методом в ЦЭЭГ Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Изоляция и идентификация вирусов гриппа проведена в культуре клеток MDCK по методу Davies H. W. с соавт. (1978) в соответствии с рекомендациями ВОЗ [497].



**Панель Р3** (n=89) - мазки из полости носа от детей в возрасте от 1 до 7 лет с симптомами ОРВИ, охарактеризованные методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ на наличие 12 респираторных вирусов – ВГрА, ВГрВ, ВПГ-1, ВПГ-2, ВПГ-3, ВПГ-4, РСВ, РВ, метапневмовируса, КВ, АДВ и БВ с помощью наборов реагентов АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL и АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия).

**Панель Р4** (n=233) – мазки из полости носа от пациентов всех возрастов с симптомами ОРВИ неустановленной этиологии (2009-2012 гг.).

**Панель Р5** (n=20) - мазки из полости носа от взрослых и детей без симптомов ОРВИ.

**Панель Р6** (n=29) - мазки или смывы из полости носа от больных всех возрастов с симптомами ОРВИ, содержащие РНК коронавирусов. Для формирования Панели 6 из панелей 1, 2, 3 и 4 были отобраны образцы, в которых методом ОТ-ПЦР-РВ обнаружена коронавирусная РНК.

При апробации лабораторных тест-систем для дифференциального выявления НК кишечных вирусов и генотипирования ротавирусов было использовано в общей сложности более 130 образцов культуральных изолятов и более 750 клинических образцов, представленных 7-ю панелями образцов.

**Панель К1** (n=39) - фекальные образцы от пациентов с подтвержденным диагнозом энтеровирусной инфекции, предоставленных ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) (репрезентативная выборка ЭВ, включая ПВ трех серотипов).

**Панель К2** (n=130) – изоляты вирусов, выделенные в культурах чувствительных клеток из клинических образцов от больных с острым вялым параличом или контактных лиц, представленные различными видами, генотипами и серотипами аденовирусов и энтеровирусов, любезно предоставленные А.Н. Лукашевым и О.Е. Ивановой, ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). Клинические образцы для изоляции были получены из разных регионов РФ и охарактеризованы культуральными, серологическими (реакция нейтрализации с типоспецифическими сыворотками) и молекулярными (видоспецифичная ПЦР) методами.

**Панель К3** – (n=45) – биологические образцы (преимущественно фекальные), содержащие ВГЕ и ВГА, любезно предоставленные К.К. Кюрегяном, ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). Образцы охарактеризованы методами ОТ-ПЦР-РВ на наличие РНК ВГА и ВГЕ в фекалиях и ИФА на наличие IgG и IgM к ВГА.

**Панель К4** (n=594) - фекальные образцы, собранные в период с января 2009 по январь 2014 гг. от 429 детей в возрасте до 5 лет (медиана 16 месяцев), госпитализированных в первые 72 часа от начала заболевания с диагнозом острый гастроэнтерит (ОГЭ) в ГБУЗ «ДГКБ Святого Владимира ДЗМ» (г. Москва) и ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 ДЗМ» (г.

Москва). У 165 детей образцы стула были собраны дважды - в день госпитализации (первичные образцы) и перед выпиской из стационара с интервалом в 7 дней (медиана) [от 6 до 8 дней] (повторные образцы). Образцы Панели К4 собирались в течение года, но более половины случаев ОГЭ (51,7%) приходилось на зимние месяцы (Рисунок 16).

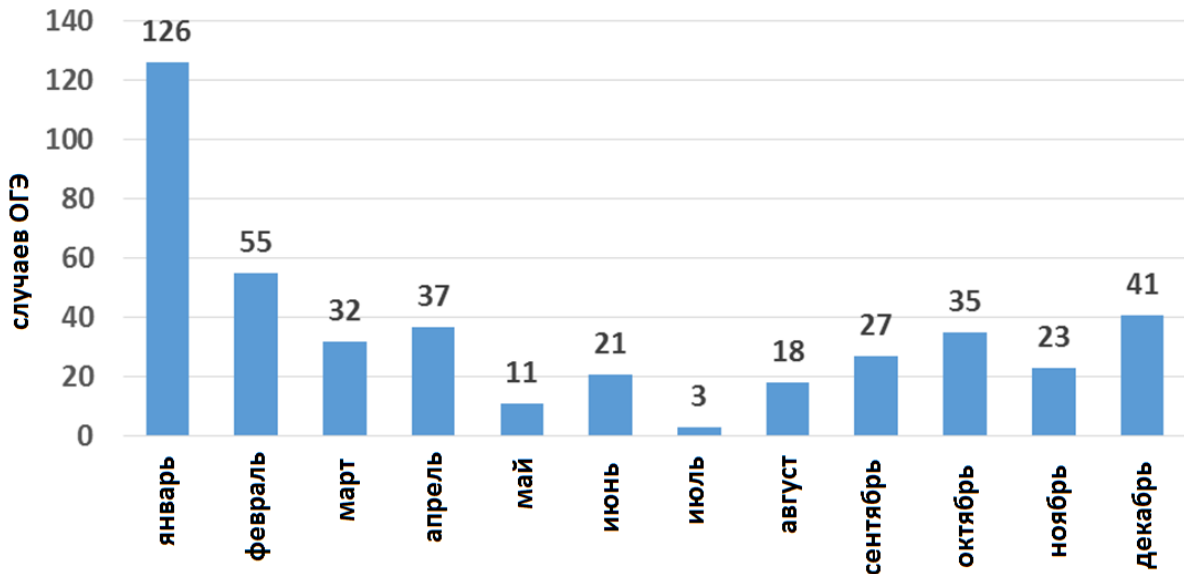


Рисунок 16 - Распределение случаев ОГЭ (n=429) по месяцам года

**Панель К5** (n=40) - фекальные образцы от детей в возрасте до 5 лет (медиана 22,5 месяца), госпитализированных в апреле 2013 г. в ГБУЗ ДГКБ Святого Владимира ДЗМ с подтвержденным диагнозом ротавирусный гастроэнтерит (иммунохроматографическая тест-система RIDA® Quick Rotavirus/Adenovirus Combi («R-biopharm AG», Германия).

**Панель К6** (n=42) - контрольная панель фекальных образцов от здоровых детей в возрасте до 5 лет (медиана – 12 месяцев), полученных летом 2010 г. из ГБУЗ МО «Мытищинская городская детская поликлиника №2».

**Панель К7** (n=289) – фекальные образцы от детей в возрасте от 1 мес. до 17 лет, госпитализированных в стационар ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского с симптомами ОГЭ в период с 2015 по 2020 гг.

**Контрольные панели зашифрованных образцов QCMD** (Quality Control for Molecular Diagnostics, Великобритания), представленных РНК или ДНК респираторных и кишечных вирусов или вирусосодержащими клиническими образцами:

1. QCMD 2010 Influenza virus A & B (INFRNA10), n=12;
2. QCMD 2010 Human Metapneumovirus & RSV (MPV.RSV10), n=12;
3. QCMD 2010 Parainfluenza virus (PINFRNA10), n=10;
4. QCMD 2010 Rhinovirus & Coronavirus (RV.CVRNA10), n=12;

5. QCMD 2010 Adenovirus DNA (ADVDNA10), n=8;
6. QCMD 2010 Norovirus RNA (NVRNA10), n= 12;
7. QCMD 2010 Enterovirus/Parechovirus RNA (EV.RNA10), n=12.

Все вирусосодержащие образцы хранили при температуре -80°C.

При исследовании генетического разнообразия папилломавирусов человека высокого и низкого онкогенного риска были использованы урогенитальные соскобы от пациентов разного пола и возраста, у которых врач заподозрил ВПЧ-инфекцию (n=12945). Образцы собраны в период с января по декабрь 2019 г. у пациентов, проживающих в шести из семи федеральных округов РФ – Центральном (n=7522), Южном (n=908), Северо-Западном (n=359), Сибирском (n=880), Уральском (n=423), Приволжском (n=1797), Северо-Кавказском (n=1056). Из Дальневосточного федерального округа, население которого составляет 5,6% от населения РФ, образцов на исследование не поступало. Пациентов с подтвержденной ВПЧ-инфекцией разделили на группы в соответствии с полом - женщины (n=4488), мужчины (n=525); возрастом - 0-14 лет (n=10), 15-19 лет (n=345), 20-29 лет (n=4346), 30-39 лет (n=2743), 40-49 лет (n=803), 50-59 лет (n=243), старше 60 лет (n=93); регионом проживания (ФО) - Центральный (n=4902), Приволжский (n=1320), Южный (n=737), Сибирский (n=572), Северо-Кавказский (n=537), Уральский (n=365), Северо-Западный (n=150).

### 2.1.3. Клеточные линии

Вирусы выращивали в чувствительных перевиваемых культурах клеток. Аденовирусы размножали в культуре клеток карциномы шейки матки человека HeLa; вирус Коксаки В и полиовирусы – в культуре клеток эпителиальной карциномы гортани человека HEp-2 (в культуре клеток HEp-2 выявлены маркеры контаминации клетками HeLa [498]); эховирусы – в клетках рабдомиосаркомы человека RD; вирусы гриппа А и В - в клетках почки собаки MDCK; РСВ – в культуре эмбриональных эпителиальных клеток почки обезьяны MA-104; ВПГ 2 и 3 типов – в клетках почки африканской зеленой мартышки Vero; SARS-CoV-2 - в клетках почки африканской зелёной мартышки Vero CCL-81. Ротавирусы выращивали в клеточных линиях MA-104 и Vero CCL-81. Вирус краснухи выращивали в перевиваемых культурах клеток почки кролика RK-13 и обезьяны Vero. Перевиваемые культуры клеток Vero (WHO), RK-13 были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия). Культура клеток MA-104 предоставлена Сомининой А.А. (ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, г. Санкт-Петербург). Культура клеток MDCK предоставлена Нагиевой Ф.Г. (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, г. Москва). Культура клеток Vero CCL-81 получена из ATCC (США).

#### 2.1.4. Животные

Для моделирования коронавирусной пневмонии, вызванной вирусом SARS-CoV-2, использовали самок золотистых сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*) SPF массой 40-50 г (НПП «Питомник лабораторных животных» ИБХ РАН, Россия). Эксперименты на животных были выполнены в соответствии с принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и для других научных целей (Страсбург, 1986) и приказом Министерства Здравоохранения РФ от 23 августа 2010 года № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики».

#### 2.1.5. Химические реактивы

В работе были использованы коммерческие препараты ферментов, солей и других реактивов фирм «Promega» (США), «Sigma» (США), «Fermentas» (Литва), «СибЭнзим» (Россия), «Merck» (Германия), «Serva» (Германия). Для культивирования линий животных клеток использовали среды и реактивы фирм «Панэко» (Россия), «Gibco» (Великобритания), «Sigma» (США). При постановке реакции ОТ использовались реактивы фирм «СибЭнзим» (Россия), «ИнтерЛабСервис» (Россия), «Синтол» (Россия). При постановке ПЦР-РВ использовалась «2,5x Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ» («Синтол», Россия). Праймеры и зонды для ПЦР-РВ, меченные различными флуоресцентными красителями (FAM, R6G, ROX и Cy5), были синтезированы в компаниях «Синтол» (Россия), «ДНК-Синтез» (Россия) или «Евроген» (Россия).

#### 2.1.6. Наборы реагентов

Набор реагентов для выявления РНК вирусов гриппа А и В в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL» («ИнтерЛабСервис», Россия).

Набор реагентов для выявления и идентификации специфических фрагментов НК возбудителей ОРВИ: «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» – для амплификации: кДНК респираторно-синцитиального вируса, метапневмовируса, вирусов парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов, коронавирусов, риновирусов, ДНК аденовирусов групп В, С и Е и бокавируса в клиническом материале («ИнтерЛабСервис», Россия).

Для выделения НК вирусов из биологических образцов использовали наборы реагентов «РИБО-сорб» и «Магно-сорб» («ИнтерЛабСервис», Россия), «QIAmp Viral RNA mini kit», («Qiagen», Германия), ZR Viral RNA Kit («Zymo Research», США), «ПРОБА-НК-ПЛЮС» («ДНК-Технология», Россия).

Для проведения реакции обратной транскрипции со «случайными» праймерами использовали комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК «Реверта-Л» («ИнтерЛабСервис», Россия).

Для постановки реакции ОТ-ПЦР-РВ использовали набор реагентов «2,5х реакционная смесь для ПЦР-РВ с Taq ДНК-полимеразой» и обратную транскриптазу MMLV («Синтол»).

Для генотипирования ВПЧ использовали набор реагентов «HPV Квант-21», («ДНК-Технология», Россия).

### 2.1.7. Олигонуклеотиды

В работе использовали специфические олигонуклеотиды как собственного дизайна, так и полученные из научной литературы.

Для выявления РНК и количественного определения вируса краснухи методом ОТ-ПЦР-РВ использовали олигонуклеотиды, представленные в Таблице 10.

Таблица 10 - Последовательности праймеров и зондов для выявления РНК вируса краснухи методом ОТ-ПЦР-РВ (собственный дизайн [499])

Вирус	Название	Последовательность 5'→3'	Координаты
Вирус краснухи	Rubf	GTCATCACCCACCGTTGT	6435-6452
	Rubr	CCTTCTGGAGGTCCTCCAT	6536-6554
	RubV	ROX-AGAGCCCCAGGGTGCCCCGAAT-BHQ2	6493-6513

Для выявления и генетической характеристики РВА использовали олигонуклеотиды, представленные в Таблице 11.

Таблица 11 - Олигонуклеотиды, использованные для генетической характеристики РВА

Название	Последовательность 5'-3'	Назначение	Мишень	Источник
unRAf1	GCCGGAGCTCTGCAGAATTCGGCTWTWAAA	Синтез полноразмерных кДНК генных сегментов РВА	5'-концевой участок генных сегментов РВА	Собственный дизайн [152]
unRAf2	GCCGGAGCTCTGCAGAATTCGGCTTTTTTT			
unRAf3	GCCGGAGCTCTGCAGAATTCGGCTTTTAAT		3'-концевой участок генных сегментов РВА	
unRAr1	GCCGGAGCTCTGCAGAATTCGGTCAAYATC			
unRAr2	GCCGGAGCTCTGCAGAATTCGGTCACA WA			
unRAr3	GCCGGAGCTCTGCAGAATTCAGCCACATG			
Up	GCCGGAGCTCTGCAGAATTC	Аmplификация генных сегментов РВА	3'-концевой участок кДНК, полученной с праймерами unRAf и unRAr	[500]
RAf1	TATTTCCACCAGGYATGAATTGGAC	Количественное определение гена VP6	ген VP6	Собственный дизайн [152]
RAf2	TATTTCCACCRGGTATGAATTGGAC			
RAr	GGTCACATCCTCTCACTACA YCAT			
PRA1	FAM-CATGCTTCT[BHQ1] AATGGAAGCYACTGTAAAAACACGp			
PRA2	FAM-ATGCTTCT[BHQ1] GATAGAGGCTACTGTAAAGACACGp			
pRAVP1f1	ATAAGAGTTGACGGAGATGACAA	Количественное определение гена VP1	ген VP1	Собственный дизайн [152]
pRAVP1f2	AATCAGAGTTGATGGT GATGATAA			
pRAVP1r	CAGCTGCTTGATCCCA YTG			
zRAVP1r	ROX-GCTTTRACTTTAGCATTCATT CGCG-BHQ2			
NVP3-FDeg	ACCATCTWCACRTRACCCTC	Количественное определение гена NSP3	ген NSP3	[130]
NVP3-R1	GGTCACATAACGCCCTATA			
NVP3-Probe	FAM – TGAGCACAATAGTT[BHQ1] AAAAGCTAACACTGTCAA p			

Для дифференциального выявления респираторных и кишечных вирусов методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ использовали олигонуклеотиды, представленные в Таблицах 12 и 13.

Таблица 12 - Последовательности праймеров и зондов для дифференциального выявления 12 групп респираторных вирусов методом ОТ-ПЦР-РВ (собственный дизайн [20])

Название	Последовательность (5'-3')	Размер ПЦР-продукта, п.н.	Выявляемый вирус, ген-мишень
Реакционная смесь 1			
А-пр	CTCCAGCAACTTCATGTCYATGGG	161	Аденовирусы, ген гексона
А-об	CACTCTGACCACGTCGAARACTTC		
А-з	FAM- AGGGTGGGCTCRTCCATGGGRTCCA -BHQ1		
Б-пр	AAAGCTGATGARAAATTCATTGA	133	Бокавирусы, ген VP1
Б-об1	GTCTTTTTTGAGCTCGCTCTT		
Б-об2	TGTCTTTTTTGGGCTCTCTCTT		
Б-з	ROX- GCGCCGTGGCTCCTGCTCT -BHQ2	120	Вирус краснухи
ВПК-пр	GTCATCACCCACCGTTGT		
ВПК-об	CCTTCTGGAGGTCCTCCAT		
ВПК-ОТ	СТТСТGGAGGTCCTC		
ВПК-з	Cy5- AGAGCCCCAGGGTGCCCGAAT -BHQ3		
Реакционная смесь 2			
ГВ-пр	GGAATGGGRACAACAGCAAC	146	Вирус гриппа В, ген М
ГВ-об	AGGTACATGACCATGAGACAR		
ГВ-от	ТААСТГАТАТАСАРААААГСАС		
ГВ-з	R6G- CATGAAGCATTTGAAATAGCAGAAGGC -BHQ-1	121	РСВ, ген L
РС-пр	CAGTCAGTAGTAGACCATGTGAATTC		
РС-об	АТАТСТТАСАТССАТАСТТТТСТГТ		
РС-пр	CAGTCAGTAGTAGACCATGT		
РС-з	ROX- GTTCTATAAGCTGGTATTGATGCAGGGA -BHQ2	202	Риновирусы, 5'-NTR
Р-пр1	TGCGTGGCTGCCTGC		
Р-пр2	TGCGTGGCGGCCAAC		

Продолжение Таблицы 12

Р-пр3	TGCGTGGCGGCCAGC		
Р-пр4	CCTGCGTGGCTGCCT		
Р-пр5	AGCCYGCGTGGTGC		
Р-об	AACACGGACACCCAAAGTAGT		
Р-от	CGGACACCCAAAGT		
Р-з	Су-5- TTAGCCRCATTCAGGGGCCG -BHQ3		
Реакционная смесь 3			
П1-пр	СТАТГАСАТСААСГАСААСААГГ	163	ВПГ-1, ген HN
П1-об	ТТТГГТСТТТСССТТГАГАТСТА		
П1-от	СТАТГАСАТСААСГАСА		
П1-з	Су5- TGCAGGAACAAGGGGTTATCAGTTATG -BHQ3		
П2-пр	СААГАСАТГААААССАТТАСАСТ	241	ВПГ-2, ген HN
П2-об	ТГААГАТТГАТТГТГГСА		
П2-от	ТТТТААГААСАТГАААААА		
П2-з	ROX- СТГАТСТАГАСТГААСТГААГАСТТГАСТТТА -BHQ2		
П3-пр	АТГГТТАСААТСТААСАААААГ	144	ВПГ-3, ген HN
П3-об	ТТГАТГТТААГААСАСТСАТ		
П3-от	ГГТТАСААТСТААСААА		
П3-з	R6G- ТАССАТСТАТТГААССААГАТАТАСТ -BHQ1		
П4-пр	ТТАААААААААААААААААА	107	ВПГ- 4, ген Р
П4-об	ТАСТТТТАГАТГГГААСТСААГ		
П4-от	ТТАААААААААААААААА		
П4-з	FAM- ССАТТААТТГАААААААААААААА -BHQ1		
Реакционная смесь 4			
ГА-пр	ТТАААААААААААААААААА	228	Вирус гриппа А, М-ген
ГА-об	АААААААААААААААААААА		
ГА-от	ТТАААААААААААААААААА		
ГА-з	FAM- СТАААААААААААААААААА -BHQ1		



Продолжение Таблицы 12

Э-пр	CTCCGGCCCCTGAAT	153	Энтеровирусы, 5'-NTR
Э-об	RATTGTCACCATAAGCAGCC		
Э-от	GGATGGCCAATCCA		
Э-з	R6G-CGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCG -BHQ1		
К-пр1	GGTGGCTGGGATGATATGTT	96-103	Коронавирусы, ген NSP13
К-пр2	TTATGGTGGTTGGAATAATATGTT		
К-пр3	GCGGGTGGGATAAATATGTT		
К-об1	TGGCATAGCACGATCACA		
К-об2	TGTTAGGCAAAGCTCTATCACA		
К-об3	TTGAGGGCATAGCTCTATCACA		
К-от1	TGGCATAGCACGAT		
К-от2	TGTTAGGCAAAGCTCTA		
К-от3	GAGGGCATAGCTCTATC		
К-з1	ROX-ATGGGTTGGGATTATCCTAAGTGTGAT-BHQ2		
К-з2	ROX-ATGGGATGGGACTATCCTAAGTGTGAT-BHQ2		

Обозначения: пр – прямой праймер, об – обратный праймер, от – праймер для ОТ, з – зонд; FAM, R6G, ROX, Cy5 – флуоресцентные красители.

Таблица 13 - Последовательности праймеров и зондов для дифференциального выявления 11 групп кишечных вирусов методом ОТ-ПЦР-РВ (собственный дизайн [135])

№ р.с.	Выявляемый вирус, ген-мишень	Название	Последовательность	Размер ПЦР-продукта, п.н.
1	Аденовирусы, ген гексона	АДВ-пр	CTCCAGCAACTTCATGTCYATGGG	160
		АДВ-об1	CACTCTGACCACGTCGAARACTTC	
		АДВ-об2	CGCACRACGTCGAAAАCTTC	
		АДВ-з	FAM-AGGGTGGGCTCRTCCATGGGRTCCA-BHQ1	

Продолжение Таблицы 13

2	Энтеровирусы, 5'-НТР	ЭВ-от	GGATGGCCAATCCA	202
		ЭВ-пр	CTCCGGCCCCTGAAT	
		ЭВ-об	RATTGTCACCATAAGCAGCC	
		ЭВ-з	R6G-GCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCG-BHQ1	
	ВПК	ВПК-от	CAGGACTATGAAAACCATTTAC	241
		ВПК-пр	AAGCTGTTCACTCACTGCTATAACC	
		ВПК-об	TGCAGGATTGATTGTGGC	
		ВПК-з	ROX-CTGATCTAGCTGAACTGAGACTTGCTTTC-BHQ2	
2	Ротавирусы А, ген NSP4	PBA-от	AWGGAAAATACGCCAT	132
		PBA-пр	CTGTTCCGAGAGAGCGC	
		PBA-об	GGAAAATACGCCATTCWGG	
		PBA1-з	FAM-CGGAAAGATGGAWAAGCTTGCCGACC-BHQ1	
		PBA2-з	FAM-CGGAAAGATGGAAAAGTTTACCGACC-BHQ1	
	Норовирусы, участок на стыке ORF1-ORF2 (RdRp-VP1)	НВ-пр1	CAATGTTCAAGRTGGATGAGRTTCTC	90
		НВ-пр2	ATGTTCCGCTGGATGCG	
		НВ-об1	TCGACGCCATCTTCATTAC	
		НВоб2	TCCTTAGACGCCATCATCATTTAC	
		НВ1-з	R6G-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-BHQ1	
		НВ2-з	R6G-GAGATCGCRATCTCCTGCCCCGA-BHQ1	
	Астровирусы ORF2	АВ-от	CTAGCCATCACACTYCTTT	165
АВ-пр		GTTGCTTGCTGCGTTCATG		
АВ-об		CTAGCCATCACACTYCTTTGGTCC		
АВ-з		ROX-CTCACAGAAGAGCAACTCCATCGCATTTG-BHQ2		
Саповирусы, ORF1	СВ-от1	CAACAGCCARCTCCA	273	
	СВ-от2	CCATTGCAAGTTCCA		

Продолжение Таблицы 13

3		СВ-пр1	AATGTSAACTAYGACCAGGCT	
		СВ-пр2	AACACCAACTATGACCAGGC	
		СВ-пр3	RAATACAAATTTTGATTTGGCC	
		СВ-об	CCCTCCATYTCAAACACTAWTTTG	
		СВ1-3	FAM-TYGTAGGTGGCGAGAGCCTGG-BHQ1	
		СВ2-3	FAM-TTGTAGGTGGCGAGGGCCAAA-BHQ1	
	Орторевовирус, сегмент L3	ОРВ-от1	ATGACTGCGACTGGAG	146
		ОРВ-от2	ATGACGGCGACTG	
		ОРВ-пр1	ATGACTGCGACTGGAGTTGC	
		ОРВ-пр2	ATGACGGCGACTGGG	
		ОРВ-об1	GATGAGTTGACGCACCACG	
		ОРВ-об2	GATGAATTAACGTACGACAGCC	
		ОРВ1-3	ROX-ACGGTCAGCATGAGTCTACCGTGG-BHQ2	
		ОРВ2-3	ROX-ACGGTCAGCGTGAGTCTACCATGG-BHQ2	
	Ротавирус С, ген VP7	РВС-пр	GAAGCTGTCTGACAAACTGGTC	126
РВС-об		GTATCAGTTATTAGGTGGAACATTTTTCTA		
РВС-3		Cy5-ATGGTTTGTACAACATTGTACACTGTTTGCG-BHQ3		
4	Вирус гепатита Е, ORF1	ВГЕ-пр	CGAYGCCATGGAGGCC	169
		ВГЕ-об1	CTGCCGGGGYTGCAAT	
		ВГЕ-об2	AGCTGSCGAGGTTGCAT	
		ВГЕ-3	ROX-ACYACCACAGCATTCGCCAAGGCGGA-BHQ2	
	Вирус гепатита А, ген 2С	ВГА-от	ATTGCATCATTGTTTTAGC	241
		ВГА-пр	GTGTCAGGATGYCCAATGAGA	
		ВГА-об	CGATCAATTGCTTCCTTAACATAAAC	
		ВГА-3	Cy5-GGAGARGAAAAATGYCTGCCCTTCTCCTCAAG-BHQ3	
Полиовирус, ген VP1	ПВ-пр1	AGAGAGATGGACATCCTBGG	211	

Продолжение Таблицы 13

5	ПВ-пр2	AAGAGTATGAGCATGCTGGG	
	ПВ-об1	GAGTGTGCTGGWCCACTGG	
	ПВ-об2	GAATGCGCCGGGCCACT	
	ПВ-об3	GARTGGGCTGGACCRCT	
	ПВ1-з	R6G-CGCACRCTGAARTCATTACACGCTGACAC-BHQ1	
	ПВ2-з	R6G-CGCACGCTGAAATCGTTACAYGCTGACAC-BHQ1	

Обозначения: пр – прямой праймер, об – обратный праймер, от – праймер для ОТ, з – зонд; FAM, R6G, ROX, Cy5 – флуоресцентные красители.

Для генотипирования РВА методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ использовали олигонуклеотиды, представленные в Таблице 14.

Таблица 14 - Перечень праймеров и зондов для генотипирования РВА методом ОТ-ПЦР-РВ (собственный дизайн [135])

№ п.с.	Название	Последовательность	Координаты	Размер ампликона, п.н.	Назначение
1	G1f	CAAGTACTCAAATCAATGAYGG	314-335	127	Идентификация варианта гена G1
	G1зонд	TCCTGTTGGCCAACCCTTTGTAА	368-390		
	G1r	GGGTCAACAGAAAAATCAAC	421-440		
	G1f ОТ	TCCAАCTGAAGCAAGT	303-318		
2	G2f	ATTTTAAAGACTACAATGATATTACTACA	398-426	208	Идентификация варианта гена G2
	G2зонд	GAATTAGATGCATCGGAGTTAGCAGATC	493-520		
	G2rev	ATATCCATTTATTTGATTCGCT	583-605		
	G2ОТ	TTTTTAACTAAAGGATGG	364-381		
3	G3f	GCAACAGAAATAAATGATAATTCA	316-339	185	Идентификация варианта гена G3
	G33онд	GCCTCGTTTTTCAGTTGATCCACAAC	421-445		
	G3r	ATGTCCAGTTGCAGTGTAGC	484-503		
	G3ОТ	GCAGCAACAGAAATAAA	318-335		
4	G4f	GAAGCTCCAАCTCAAATYAG	308-329	133	Идентификация варианта гена G4
	G43онд	CATCCTTTGGTTAAAAACAGCTGAGATA	353-380		

Продолжение Таблицы 14

	G4r	GGTCGATGGAAAATTCTAAAAC	422-440		
	G4OT	CTCAACACAAGACAATAAT	255-273		
5	G9f	GAAGCATCAACTCAAATTGG	310-329	196	Идентификация варианта гена G9
	G93онд	ATCGCTTCATTCTCAATTGATCCACAAC	418-445		
	G9Rev	GACATATCTAGCTCTAACGTTGAATC	481-506		
	G9OT	GCAAATTCATCACAGC	250-265		
1	P4f	ACCACATGTYAGTCAAACAA	336-355	159	Идентификация варианта гена P4
	P43онд	CAAATAGGCAATATGTTTTATTTGGTG	353-379		
	P4r	TAGAGGTTAGAGTCCGTCTATTAGA	463-487		
	P4OT	ATAATAGTGACTTTTGGAC	299-317		
2	P6f	CGACAACRATAGAGCCAGTAC	184-204	98	Идентификация варианта гена P6
	P63онд	AGCCACCAARCGATTACTGGATA	235-257		
	P6r	CTTGTTGATTAGTTGGATTCAA	261-282		
	P6OT	GTGAATGATTCGACAAC	174-190		
3	P8f1	GCACGTCGATCCAGTAGA	339-357	231	Идентификация варианта гена P8
	P8f2	CGCACGTTAAYCCAGTAGA			
	P83онд	ATGGTGGAAGARTATGGACATTTTCATG	515-541		
	P8r1	TCAGTAGTAGCTCTYGGTGTTT	547-569		
	P8r2	CAGTAGTAGCYCTCGGTGTTT			
P8OT	TTGGGACCTTGGAAT	630-644			
4	I1f	AACAGTTGGACTTACRTTACGT	977-998	116	Идентификация варианта гена I1
	I13онд	TGTGAATCAGTGCTTGCGGATG	1014-1035		
	I1r	CTGGTATAGCATACTCTTGACGYA	1069-1092		
	I1OT	CATGCAACAGTTGG	972-985		
5	I2f1	TAGCAAATGTGACATCTGTTAG	1047-1072	196	Идентификация варианта гена I2
	I2f2	ATGTTAGCTAATGTAACRTCTGTTAG			
	I23онд	CATGCTTCTAATGGAAGCCACTGT	1182-1205		
	I2r1	GGATACCAAGTGGTTAGCTTG	1222-1243		
	I2r2	TGGATACCAAGTAATTAGCTCG			
I2OT	CATTTGAACATCATGC	961-976			

## 2.2 МЕТОДЫ

### 2.2.1 Культивирование клеток млекопитающих

Культуры клеток Vero CCL-81 и Calu-3 выращивали в среде ДМЕМ («ПанЭко», Россия) с добавлением L-глутамина (300 мкг/мл), гентамицина (40 мкг/мл), в присутствии 5% эмбриональной сыворотки коров (ЭСК) «Gibco» (США). Культуру клеток MA-104 выращивали в среде MEM с солями Эрла («ПанЭко», Россия) с добавлением L-глутамина (300 мкг/мл), гентамицина (40 мкг/мл) в присутствии 5% ЭСК «Hy Clone» (США). Перевиваемые клеточные линии RK-13 и Vero (WHO) культивировали в питательных средах RPMI 1640 «Gibco» (США) или MEM «Gibco» (США) в присутствии 10% ЭСК «Hy Clone» (США), 1 мМ глутамина «Gibco» и 100 мкг/мл гентамицина «Gibco» при температуре +37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> [22].

### 2.2.2 Культивирование вирусов

**Культивирование SARS-CoV-2.** За трое суток до заражения коронавирусом SARS-CoV-2 клетки Vero CCL-81 высевали в культуральные флаконы («Corning», США) площадью 75 см<sup>2</sup> с кратностью посева 1:5. На 3-и сутки, после достижения 100%-го монослоя, из флакона удаляли культуральную жидкость и добавляли вирусный материал при множественности заражения (MOI) от 0,01 до 0,0001 ТЦД<sub>50</sub> на клетку. Адсорбцию вируса проводили в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 60 мин, затем добавляли поддерживающую среду (ДМЕМ, L-глутамин - 300 мкг/мл, гентамицин - 40 мкг/мл, 1% эмбриональной сыворотки коров («Gibco»)) и инкубировали при температуре 37°C до проявления ЦПД в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. При появлении ЦПД собирали вирусосодержащую культуральную жидкость, осветляли центрифугированием, аликвотировали и хранили при температуре -80°C [636].

**Культивирование ротавирусов.** Ротавирусы выращивали в культуре клеток MA-104. Для активации к вирусному материалу добавляли трипсин до концентрации 5 мкг/мл и инкубировали смесь 1 час при 37°C. Разбавляли активированный вирус средой с трипсином в концентрации 2 мкг/мл. Удаляли ростовую среду из флакона с клетками MA-104 и трижды промывали монослой клеток поддерживающей средой (5 мл среды на флакон). Вносили вирус при желаемой MOI, инкубировали 1 час в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. После инкубации с вирусом добавляли необходимый объем поддерживающей среды с трипсином 2 мкг/мл. Инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C до появления ЦПД (от 3 до 5 суток). Состав поддерживающей среды: среда MEM с солями Эрла («ПанЭко», Россия), 300 мкг/мл L-глутамина, 40 мкг/мл гентамицина.

**Культивирование вируса краснухи.** Вирус краснухи выращивали в культуре клеток Vero (WHO). Монослой клеток Vero заражали вирусом краснухи при MOI 0,01 ТЦД<sub>50</sub>/клетку, инкубировали в течение 1-1,5 часов при 35°C, удаляли вирусный материал и добавляли 30 мл питательной среды MEM с 2% ЭТС и 50 мкг/мл гентамицина. Для накопления вируса

зараженные клетки инкубировали в течение 12 дней в культуральных флаконах T25 («Greiner Bio-One», Австрия). В экспериментах по оценке температурной чувствительности зараженные клетки культивировали при 33°C, 35°C, 37°C, 39°C, а сбор вирусного материала проводили на 3-7 сутки после заражения [530, 618].

### 2.2.3 Титрование вирусов по конечной точке ЦПД

Титр вирусов определяли по конечной точке проявления ЦПД в культуре чувствительных клеток. Клетки выращивали в 96-луночных планшетах. Через 1-3 суток, после формирования монослоя, из лунок планшета удаляли ростовую среду, вносили последовательные десятикратные разведения вируса в поддерживающей среде и инкубировали в течение 5 суток в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37<sup>0</sup>C. Титрование *ca* штаммов D-D2 и D-B4 SARS-CoV-2 проводили при температуре 30<sup>0</sup>C. Учет результатов титрования проводили визуально путем микроскопического исследования клеточного монослоя на наличие характерного ЦПД на 5-е сутки после заражения (округление и открепление клеток от монослоя). Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [501] или Ramakrishnan M.A. с соавт. [502] и выражали в lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Титр вируса SARS-CoV-2 определяли по конечной точке проявления ЦПД в культуре клеток Vero CCL-81, ротавирусов - в культуре клеток MA-104 [636]. Титрование вируса краснухи проводили в культуре клеток RK-13 согласно общепринятой методике [503].

### 2.2.4 Оценка выживаемости клеток млекопитающих в МТТ-тесте

Выживаемость клеток, зараженных вирусом, оценивали с помощью витального красителя МТТ. На 5 сутки после заражения в лунки с клетками 96-луночного планшета добавляли по 20 мкл раствора МТТ, 5 мг/мл («ПанЭко», Россия) и инкубировали при 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 2 часов. Далее культуральную жидкость отбирали и добавляли в лунки по 100 мкл ДМСО («Sigma-Aldrich», кат.номер D4540-1L) в каждую лунку. С помощью планшетного спектрофотометра определяли оптическую плотность каждой лунки при 530 нм с учетом фоновых значений при 620 нм. Выживаемость клеток рассчитывали по формуле:

$$\text{Выживаемость} = \frac{\text{ОП}_{530} \text{опытной пробы}}{\text{ОП}_{530} \text{клеточного контроля}} \times 100\%, \text{ где}$$

ОП<sub>530</sub> опытной пробы - среднее значение ОП<sub>530</sub> в лунках с зараженными клетками; ОП<sub>530</sub> клеточного контроля - среднее значение ОП<sub>530</sub> в лунках с незараженной клеточной культурой [636].

### 2.2.5 Оценка *ts* фенотипа *ca* мутантов SARS-CoV-2 *in vitro*

Клетки Vero CCL-81 заражали *ca* мутантами SARS-CoV-2 и родительским штаммом D при MOI 0,001 и 0,00001 ТЦД<sub>50</sub> на клетку и инкубировали при температуре 37°C и 39°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 3 суток. Ежедневно отбирали образец культуральной жидкости и хранили при температуре -80°C до исследования. В отобранных образцах определяли титр

вируса и концентрацию вирусной РНК. Снижение титра *sa* мутанта вируса или концентрации вирусной РНК по сравнению с заражением родительским штаммом D на 4,0 lg и более при MOI 0,001 свидетельствовала о наличии у вируса выраженного *ts* фенотипа.

### 2.2.6 Дизайн праймеров и зондов для ПЦР-РВ

Анализ вирусных геномов, выравнивание последовательностей вирусных геномов и подбор последовательностей праймеров и зондов проводили с помощью компьютерных программ FastPCR professional v. 6.1.32.beta3 («PrimerDigital Ltd.», Финляндия), Omega v. 2.0 («Oxford Molecular Ltd.», США) и Vector NTI Advance v. 9.0 («InforMax Inc.», США), а также Интернет-программы BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (NCBI, США) [504].

Дизайн последовательностей праймеров и зондов осуществляли в соответствии со следующими критериями:

- соответствие последовательностей праймеров и зондов геномам максимально возможного числа генетических вариантов выявляемого вируса;
- праймеры и зонды не должны быть комплементарными геномным последовательностям гетерологичных вирусов и человека;
- размер праймеров должен составлять 18-25 н., а зондов – 20-30 н.;
- температура плавления ( $T_m$ ) праймеров должна быть в пределах 55-60°C, а зондов – 65-70°C.  $T_m$  зондов, должна быть на 5-10°C выше  $T_m$  соответствующих праймеров;
- размер ПЦР-продукта должен находиться в пределах 100-300 п.н.;
- доля оснований G/C в области связывания матрицы с олигонуклеотидами должна находиться в пределах 40-60%;
- последовательности праймеров и зондов, находящихся в составе одной реакционной смеси (р.с.), должны исключать возможность взаимодействия друг с другом, особенно с образованием дуплексов с участием 3'-концевой области праймеров;
- выбор красителя для флуоресцентно-меченных зондов и распределение зондов по реакционным смесям при проведении мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ проводится так, чтобы в одной р.с. находились зонды, меченные разными красителями;
- не допускается несовпадений между последовательностью 3'-концевой области праймеров и 5'-концевой области зонда с геномом вирусов;
- в 5'-концевой области праймеров и 3'-концевой области зонда допускается не более 2 несовпадений с последовательностью генома соответствующего вируса.

### 2.2.7 Получение мазков из полости носа для исследования методом ПЦР

Взятие мазков производили стерильными велюр-тампонами с гибким аппликатором («Соран», Италия). Пациент освобождал носовые ходы от слизи, запрокидывал голову, после чего ему в ноздрю вводили по наружной стенке носа тампон на глубину 2-3 см до нижней носовой раковины. Затем тампон слегка опускали книзу и вводили тампон в нижний носовой



ход под нижнюю носовую раковину, делали вращательное движение, соскабливая клетки эпителия, и вынимали. После забора материала рабочую часть зонда с велюр-тампоном помещали в стерильную пробирку с транспортной средой или без нее и помещали на временное хранение в морозильную камеру (-20°C). Образцы транспортировали в лабораторию в замороженном виде и до момента анализа хранили при -70°C [26].

### **2.2.8 Подготовка фекальных проб для ПЦР-исследования**

До приготовления фекальной суспензии поступивший в лабораторию клинический образец делят на две части, одну часть используют для приготовления суспензии, другую хранят при минус 20°C. Для тестирования в культуре клеток фекальные пробы обрабатывают хлороформом для удаления бактерий, грибов, цитотоксичных липидов и разрушения вирусных агрегатов. Для приготовления 20% фекальной суспензии устойчивые к хлороформу полиэтиленовые центрифужные пробирки ёмкостью 50 мл маркируют в соответствии с номером пробы. В каждую пробирку вносят 10 мл фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ) с антибиотиками, 1 г стеклянных бусин и 1 мл хлороформа. В пробирку вносят 2 г фекальной пробы. Плотнo закрывают центрифужную пробирку и тщательно встряхивают в течение 20 мин в механическом шейкере или вручную. Центрифугируют 20 мин при 1500 g в центрифуге с охлаждением. Надосадочную жидкость каждой пробы переносят в два маркированных флакона с винтовой крышкой. Если жидкость непрозрачна, обработку хлороформом повторяют.

Для тестирования методом ПЦР образцы готовили по методике, указанной выше, либо применяли упрощенную методику. Образцы фекалий, смешанные с фосфатно-солевым буфером (рН 7,4) в соотношении 1:4 по объему, гомогенизировали на встряхивателе до однородной суспензии. Центрифугировали при 10 тыс. об./мин. на микроцентрифуге в течение 10 мин. Далее отбирали супернатант и использовали для выделения вирусной НК.

### **2.2.9 Выделение вирусных нуклеиновых кислот**

Вирусные НК выделяли коммерческими наборами реагентов, перечисленными в главе 2 «Материалы и методы» (п. 2.1.6), в соответствии с инструкциями фирм-производителей. В основе всех наборов реагентов лежат модификации метода Boom R. с соавт. [505].

### **2.2.10 Реакция обратной транскрипции**

При постановке реакции ОТ 3-6 пмоль вирусоспецифичного праймера для ОТ смешивали с 8 мкл РНК и прогревали в течение 5 мин при 65°C (для ротавирусов – 1 мин при 95°C). Далее в 25 мкл р.с., содержащей, помимо праймера и РНК, 10 мкл «Реакционной смеси 2,5<sup>x</sup> для проведения ПЦР-РВ» и 25 ед. ревертазы вируса лейкоза Молони (MMLV) («Синтол», Россия) в течение 30 мин при 42°C получали кДНК. Фермент инактивировали прогреванием р.с. при 95°C в течение 5 мин. Реакционная смесь для проведения реакции ОТ в мультиплексном формате

содержала от 10 до 13 праймеров для ОТ (в зависимости от тест-системы) в количестве по 2 пмоль каждого праймера на р.с. [521, 522].

### 2.2.11 ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени

ПЦР-РВ проводили, используя принцип «выщепления 5'-концевой метки», известный как «TaqMan real-time PCR». При необходимости интеграции ПЦР-РВ с реакцией ОТ в большинстве случаев проводили двухэтапную ОТ-ПЦР-РВ в одной пробирке. Данная модификация предусматривала получение кДНК в объеме 25 мкл с последующим добавлением ПЦР-смеси объемом 25 мкл и проведении ПЦР-РВ в той же пробирке. В моноспецифическом формате постановки в р.с. присутствовал только один набор вирусоспецифичных праймеров и зондов. При постановке мультиплексной ПЦР-РВ амплификацию проводили в 50 мкл р.с., которая содержала 10 мкл «2,5<sup>x</sup> реакционной смеси для ПЦР-РВ» («Синтол», Россия), смесь от 2-х до 4-х наборов праймеров (по 6 пмоль каждого праймера), от 2-х до 4-х зондов (по 5 пмоль каждого зонда), 2,5 ед. Hot Start Taq-ДНК-полимеразы и 25 мкл кДНК. Реакцию проводили в термоциклерах АНК-32 (Институт аналитического приборостроения РАН, г. Санкт-Петербург, Россия), ДТ-96, ДТпрайм 4 или ДТпрайм 5 («ДНК-Технология», Россия). Температурно-временной режим: 95°C – 120 сек. – 1 цикл; 95°C – 20 сек., 55-60°C – 40-50 сек. – 45 циклов. Достоверное превышение величины флуоресцентного сигнала над интенсивностью фоновой флуоресценции, выраженное в виде значения порогового цикла (ПЦ), являлось критерием положительного результата. Значение ПЦ определяли с помощью программного обеспечения к амплификаторам согласно руководству, прилагаемому к соответствующему прибору [521, 522, 636].

### 2.2.12 Выявление вирусной РНК методом ОТ-ПЦР-РВ

**Выявление РНК SARS-CoV-2** в клинических образцах проводили методом ОТ-ПЦР-РВ с помощью набора реагента «РеалБест РНК SARS-CoV-2» («Вектор-Бест», Россия) согласно инструкции по применению. Выявление вирусной РНК и мониторинг репликации вирусной РНК в культуре клеток и органах зараженных животных проводили методом количественной одноэтапной ОТ-ПЦР-РВ с набором праймеров и зондов к гену N SARS-CoV-2 [506]. Для постановки реакции ОТ-ПЦР-РВ использовали набор реагентов «2,5x реакционная смесь для ПЦР-РВ с Taq ДНК-полимеразой» и обратную транскриптазу MMLV («Синтол», Россия). Р.с. объемом 25 мкл содержала по 10 пмоль каждого праймера и 5 пмоль зонда, Taq ДНК-полимеразу, 30 ед. обратной транскриптазы. Температурно-временной режим: 45°C – 10 мин (1 цикл); 95°C – 5 мин (1 цикл); 95°C – 5 сек., 55°C – 45 сек. (45 циклов) [636].

**Выявление ротавирусной РНК** проводили методом ОТ-ПЦР-РВ, используя набор праймеров и зонд TaqMan к гену NSP3 РВА (Таблица 11) [130]. Для оценки эффективности амплификации сегментов гена РВА использовали праймеры и зонды TaqMan для генов NSP3,

VP6 и VP1 (Таблица 11). Образец выделенной РНК (10 мкл) смешивали с 3 пмоль праймера для ОТ, инкубировали при 95°C в течение 1 мин и охлаждали в течение 2–3 мин при комнатной температуре. Реакции ОТ проводили в общем объеме 25 мкл, содержащем праймер ОТ и 25 единиц обратной транскриптазы MMLV («Синтол»). Стадия ОТ включала инкубацию для синтеза кДНК при 45°C в течение 30 мин и инактивацию обратной транскриптазы MMLV при 95°C в течение 5 мин. ОТ-ПЦР-РВ проводили в общем объеме 50 мкл, содержащем 25 мкл матричной кДНК, 6 пмоль каждого прямого и обратного праймеров, 5 пмоль зонда и 2,5 единицы ДНК-полимеразы SynTaq («Синтол») на реакцию. Температурно-временной режим: 95°C - 2 мин, 45 циклов при 95°C - 20 с и 60°C в - 50 секунд. Для построения калибровочного графика и расчета концентрации кДНК использовали очищенный из агарозного геля ампликон с известной концентрацией [135].

### **2.2.13 Определение титра вируса краснухи по содержанию вирусной РНК**

Вирусную РНК из исследуемых и калибровочных образцов выделяли при помощи коммерческого набора QIAamp Viral RNA Mini Kit («Qiagen», Германия) согласно инструкции. При постановке реакции ОТ 2 мкл обратного праймера Rubr (Таблица 10) в концентрации 5 пмоль/мкл смешивали с 10 мкл соответствующей вирусной РНК и прогревали в течение 5 мин при 65 °С в твердотельном термостате. Далее в 30 мкл р.с., содержащей помимо праймеров и РНК, буфер для ПЦР-РВ («Синтол», Россия), 0,5 мМ дНТФ («Синтол»), 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub> («Синтол»), 4 ед. ингибитора рибонуклеаз (Сибэнзим, Россия), 50 ед. MMLV ревертазы («Сибэнзим»), в течение 30 мин при 42 °С получали кДНК. Фермент инактивировали нагреванием при 95 °С в течение 5 мин. Образцы анализировали методом ПЦР-РВ по типу «выщепления 5'-концевой метки» (TaqMan<sup>®</sup>). Амплификацию проводили в 50 мкл р.с., содержащей 10-кратный буфер, прямой и обратный праймеры (по 10 пмоль каждого), 5 пмоль зонда, 0,5 мМ дНТФ, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2,5 ед. HotStart Taq ДНК-полимеразы («Синтол») и 5 мкл кДНК. Реакцию проводили в термоциклере ДТ-96 («ДНК-технология»). Программа ПЦР: 120 сек при 95 °С – 1 цикл, 50 сек при 58 °С и 20 сек при 95 °С – 45 циклов [22].

### **2.2.14 Гель-электрофорез ДНК**

Электрофоретический анализ ампликонов проводили в 1-2% агарозном геле, в присутствии интеркалирующего агента – бромистого этидия. Результаты электрофореза визуализировали и документировали в средневолновом ультрафиолетовом свете (312 нм) при помощи гель-документирующей системы Gel Imager («Хеликон», Россия). В качестве положительного контроля использовали коммерчески доступные ДНК-маркеры молекулярного веса [26].

### **2.2.15 Получение положительных контрольных образцов и контрольных образцов чувствительности для лабораторных ПЦР-тест-систем**

Клонирование ПЦР-продуктов в плазмиде pGEM<sup>®</sup>T-Easy («Promega», США) проводили согласно рекомендациям производителя. Первичный скрининг клонов рекомбинантных плазмид проводили методом бело-голубой селекции [507]. Наличие вставки ожидаемого размера в плаزمиде, выделенных из белых колоний, подтверждали рестрикционным анализом – расщеплением плазмид рестриктазой EcoRI, сайты которой фланкируют вставку. Отобранные плазмидные клоны готовили для секвенирования с помощью набора Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification Systems («Promega», США). Секвенирование плазмидной ДНК проводили на автоматическом секвенаторе CEQ8000 согласно рекомендациям и, используя реактивы производителя («Beckman-Coulter», США), либо передавали образцы для секвенирования в ЗАО «Синтол» (Россия). Для секвенирования использовали стандартные праймеры T7 и SP6, предназначенные для амплификации области полилинкера плазмид семейства pGEM<sup>®</sup>.

Получение фрагментов геномов РНК-содержащих вирусов начинали с гидролиза плазмид pGEM<sup>®</sup>T-Easy со встроенными фрагментами вирусного генома. В зависимости от промотора (T7 или SP6) использовали различные рестриктазы - PvuII, SalI, NcoI, NdeI. Результат рестрикционного анализа контролировали методом электрофореза в агарозном геле. Далее с линейризованными плазмидами проводили реакцию транскрипции. Все работы этой стадии осуществлялись на льду. Реакцию транскрипции проводили в суммарном объеме 100 мкл. Для этого смешивали 1 мкг ДНК-матрицы с 20 мкл 5<sup>x</sup> буфера для транскрипции, 10 мкл ДТТ, 5 мкл ингибитора рибонуклеаз (20 ед/мкл), 20 мкл смеси рНТФ (по 2,5 мМ каждого), 2 мкл T7 или SP6 РНК-полимеразы (40 ед/мкл) - в зависимости от ориентации вставки в плазмиде и желаемой полярности транскрипта и 33 мкл деионизированной воды, свободной от РНКаз. Далее смесь инкубировали при 37°C в течение 2 часов. Полученные транскрипты обрабатывали ДНКазой, свободной от РНКаз. В работе использовали реактивы фирм «Promega» (США) и «Fermentas» (Литва). Разрушение ДНК контролировали методом электрофореза в агарозном геле. После обработки ДНКазой проводили фенол-хлороформную экстракцию, спектрофотометрически оценивали концентрацию РНК, транскрипты аликвотировали по 2 мкл и хранили при -80°C. Для идентификации транскрипта одну аликвоту разбавляли в 100 000 раз водой, свободной от РНКаз, и анализировали в 2 реакциях: ПЦР-РВ и ОТ-ПЦР-РВ с соответствующим набором праймеров и зондов.

### **2.2.16 Расчет показателей диагностической ценности набора реагентов**

*Аналитическую чувствительность* наборов реагентов оценивали с использованием контрольных образцов на основе рекомбинантных плазмид со встроенным фрагментом вирусного генома, либо соответствующего транскрипта. Альтернативным подходом являлось

использование синтетического олигонуклеотида, соответствующего по последовательности ПЦР-продукту.

*Аналитическую специфичность* оценивали путем исследования образцов гетерологичных лабораторных штаммов вирусов и бактерий для оценки вероятности неспецифических перекрестных реакций.

*Диагностическую чувствительность* набора реагентов рассчитывали определением доли положительных результатов, полученных при исследовании охарактеризованной панели клинических «истинно положительных» образцов, выражая ее в процентах. За «истинно положительные» принимали образцы, в которых референсным методом был выявлен соответствующий вирус.

*Диагностическую специфичность* набора реагентов рассчитывали определением доли отрицательных результатов, полученных при исследовании охарактеризованной панели клинических образцов от здоровых людей, выражая ее в процентах. Отсутствие вирусной НК в образцах панели подтверждали референсным методом.

*Воспроизводимость* оценивали при трехкратном тестировании набором реагентов охарактеризованной референсными методами панели клинических образцов и вычислении процента совпадающих результатов. Для оценки воспроизводимости формировали панель образцов, составленную из клинических образцов, содержащими анализируемые набором реагентов вирусы, а также ряд проб от здоровых людей, не содержащих вирусных НК.

#### **2.2.17 Генотипирование ВПЧ методом ПЦР-РВ**

Генотипирование ВПЧ, обнаруженных в клинических образцах, проведено в диагностической лаборатории ООО «Диалаб-Плюс» (г. Москва, Россия) при помощи набора реагентов HPV Квант-21, предназначенного для выявления и типирования ВПЧ-HP (HPV 6, 11, 44) и ВПЧ-ВР (HPV 16, 18, 26, 31,33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) («ДНК-Технология», Россия). Набор реагентов зарегистрирован в Росздравнадзоре, разрешен для клинического применения на территории РФ, а также имеет международный CE IVD сертификат. Выделение ДНК проводили с помощью набора реагентов «ПРОБА-НК-ПЛЮС» («ДНК-Технология», Россия) в соответствии с инструкцией по применению. Амплификацию и детекцию результата проводили на приборе ДТ-Прайм («ДНК-Технология», Россия). Результаты генотипирования ВПЧ учитывали при условии, что концентрация ДНК ВПЧ составляла  $\geq 3,0 \lg$  копий ДНК/мл.

#### **2.2.18 G/P-генотипирование штаммов РВА методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ**

G/P-генотипирование штаммов РВА выполняли с помощью типоспецифической мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ, как описано ранее [26]. Выявленные в клинических образцах ротавирусы генотипировали в реакции мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ в 5 пробирках, используя

наборы праймеров и зондов (Таблица 14) для дифференциального выявления доминирующих вариантов генов ротавирусов группы А: VP7 (G1, G2, G3, G4, G9), VP4 ([P4], [P6], [P8]), VP6 (I1, I2).

### **2.2.19 Установление видовой принадлежности сезонных коронавирусов человека в реакции ОТ-ПЦР-РВ**

Определение вида КВ проводили одновременно в двух реакционных смесях в мультиплексном формате ОТ-ПЦР-РВ. Первая р.с. содержала набор праймеров и зондов для выявления альфакоронавирусов HCoV-229E и HCoV-NL63, а вторая – бетакоронавирусов HCoV-NKU1 и HCoV-OC43 как описано в работе Gaunt E.R. с соавт. [508].

### **2.2.20 Секвенирование генома вируса краснухи**

Для секвенирования генома вируса краснухи подбирали праймеры для амплификации перекрывающихся фрагментов вирусного генома. При постановке реакции ОТ 2 мкл праймера (5 пмоль/мкл) смешивали с 5 мкл вирусной РНК и прогревали р.с. при 65°C в течение 5 мин. кДНК получали в р.с. объемом 30 мкл, содержащей помимо праймера и РНК, буфер для ОТ, 0,5 мМ дНТФ, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 4 ед. ингибитора рибонуклеаз, 50 ед. ревертазы RevertAid H Minus M-MuLV («Fermentas», Литва) [618]. Р.с. инкубировали в течение 30 мин при 42°C, после чего инактивировали ревертазу при 95°C в течение 5 мин. ПЦР проводили в амплификаторе «Циклотемп» (Россия) с использованием набора реагентов для проведения ПЦР-РВ («Синтол», Россия) или, при амплификации GC-богатых фрагментов, набора реагентов TaKaRa LA with GC buffer («Takara», Япония) по протоколу, рекомендованному производителем. В состав р.с. входили прямой и обратный праймер (по 5 пкмоль на р.с.), буфер для ПЦР 10x, «Синтол» (Россия), 2,5 мМ каждого дНТФ, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мкл вирусной кДНК, 0,25 мкл Hot Start Taq ДНК-полимеразы «СибЭнзим», (Россия), доводили до конечного объема деионизованной водой. Для увеличения выхода ПЦР-продукта в р.с. добавляли бетаин «Sigma Aldrich» (США) до концентрации 5 мМ и 5% ДМСО «Sigma Aldrich» (США). При использовании набора «TaKaRa LA with GC buffer» «Takara» (Япония) р.с. содержала 1,25 ед TaKaRa LA Taq, GC буфер 1 или 2 для TaKaRa LA Taq, 200 мкМ каждого дНТФ, 5% ДМСО, прямой и обратный праймер в концентрации 5 пкмоль на р.с. каждого, 1 мкл кДНК. Температурно-временной режим: 94°C – 40 сек – 1 цикл, 94°C - 30 сек., 60°C - 30 сек., 72°C - 120 сек. - 40 циклов, 72°C - 5 мин. – 1 цикл. Очистку полученных ПЦР-продуктов проводили на колонках фирмы «Omnix» (Россия) по протоколу фирмы-производителя. Концентрацию ДНК оценивали визуально после электрофоретического разделения с маркером молекулярного веса ДНК 100bp+2kb+3kb («СибЭнзим», Россия). Образцы ДНК секвенировали методом терминации цепи по Сэнгеру на приборе CEQ 8000 («Beckman Coulter», США) с использованием набора реагентов («The

GenomeLab Methods Development Kit», США) в соответствии с рекомендациями производителя, либо передавали для секвенирования в ЗАО «Синтол» (Россия) [618].

### **2.2.21 Амплификация генных сегментов ротавирусов**

Полноразмерную кДНК сегментов гена ротавируса получали в реакции ОТ со смесью праймеров: unRAf1, unRAf2, unRAf3, unRAr1, unRAr2, unRAr3 (Таблица 11), по 3 пмоль каждого на реакцию в условиях, указанных выше. Для одновременной амплификации всех сегментов гена РВА использовали «универсальный» праймер Up (Таблица 11), описанный Froussard P. с соавт. [500]. Амплификацию проводили в общем объеме 50 мкл в р.с. следующего состава: кДНК - 5 мкл, LongAmp™ Taq 2X Master Mix (NEBNext, США) – 25 мкл, ddH<sub>2</sub>O – 18 мкл, универсальный праймер Up - 20 пмоль. Температурно-временной режим: 94°C - 2 мин., затем 40 циклов: 94°C - 30 сек., 65°C - 30 сек., 68°C - 3,5 мин. Полученные ампликоны анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле с бромидом этидия (0,5 мкг/мл), очищали с использованием набора CleanUp Mini (Евроген, Россия), а концентрацию и чистоту ДНК оценивали спектрофотометрически (A260/230, 260/280) [152].

### **2.2.22 Нанопоровое секвенирование ротавирусного генома**

Нанопоровое секвенирование проводили на приборе MinION с использованием проточной ячейки R9.4.1 (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Подготовку библиотеки ДНК для НПС проводили с помощью набора Rapid Sequencing Kit (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания) [152]. Каждую библиотеку ДНК анализировали в течение 6 часов или более с помощью программы MinKNOW. Для классификации чтений был разработан конвейер, обеспечивающий идентификацию прочтений путем запуска программы BLAST [504] на основе эталонных последовательностей сегментов генома РВА и скрипта [509], написанного на языке программирования Python (Python Software Foundation). Затем проводили выравнивание с помощью программы Minimap2 [510], а консенсусная последовательность была сгенерирована с помощью скрипта [511], написанного на Python. Установление генотипа РВА по нуклеотидным последовательностям генных сегментов проводили с помощью онлайн-сервиса на основе программного обеспечения, написанного Дэном Кацелем из Института Дж. Крейга Вентера, которое представляет собой усовершенствованную реализацию онлайн-программы RotaC2.0 [142].

### **2.2.23 Нанопоровое секвенирование генома SARS-CoV-2**

Для получения пула ампликонов и подготовки библиотек ДНК для последующего полногеномного секвенирования использовали набор реагентов NEBNext® ARTIC SARS-CoV-2 (Oxford Nanopore Technologies). Данный набор реагентов разработан на основе протокола «SARS-CoV-2 McGill Nanopore sequencing protocol SuperScript IV\_42C\_ArticV3» [512]. Для подготовки к секвенированию полученной библиотеки ДНК использовали наборы Ligation

Sequencing kit 1D и Native Barcoding Kit 1D (Oxford Nanopore Technologies). Секвенирование проводили в проточной ячейке Flow Cell R9.4 с использованием программного обеспечения «MinKNOW» («Oxford Nanopore Technologies»). Сборку генома осуществляли в программе «Minimap2 v. 2.24 [510].

#### **2.2.24 Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей**

Анализ последовательностей вирусных геномов и построение филогенетических деревьев проводили в программе MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) различных версий (от MEGA5 до MEGA11) [513]. Филогенетические деревья строили методом максимального правдоподобия, используя двухпараметрическую эволюционную модель Kimura. Надежность формирования узлов дерева оценивали методом «бутстрэп»-анализа и выражали как процент от 500 альтернативных деревьев, поддерживающих данную группу.

#### **2.2.25 Тест на иммуногенность вируса краснухи**

Антигенные свойства вариантов штамма С-77 (*wt*, *ca39*, *ca46*) и штамма Wistar RA27/3 вируса краснухи изучали с использованием иммунологического маркерного теста на кроликах. Для постановки теста использовали самок кроликов породы «шиншилла» весом 2,5-3 кг. Каждый штамм испытывали на двух животных. Вирусосодержащую жидкость (ВСЖ) с титром  $3,0 \text{ Ig TЦД}_{50}/\text{мл}$  вводили по 1,0 мл внутривенно. Далее сыворотки крови исследовали в реакции нейтрализации и ИФА. Реакцию нейтрализации проводили с использованием реакции ЦПД в культуре клеток RK-13. Готовили разведения иммунной сыворотки и добавляли равный объем ВСЖ с титром вируса  $3,0 \text{ Ig TЦД}_{50}/\text{мл}$ . Учитывали предельное разведение сыворотки, при котором не наблюдается ЦПД вируса. IgG кролика к вирусу краснухи определяли методом ИФА с помощью набора реагентов «Векто-Рубелла – IgG» («Вектор-Бест», Россия) по протоколу, рекомендованному производителем. Сыворотки разводили 1:100, связавшиеся антитела выявляли при инкубации с конъюгатом козьих антикроличьих IgG антител «Sigma Aldrich» (США) с пероксидазой хрена. Результаты учитывали на приборе Anthos Zenith 3100 («Anthos Labtec Instruments GmbH», (Австрия).

#### **2.2.26 Определение антител к SARS-CoV-2 методом твердофазного ИФА**

Для определения суммарных антител к SARS-CoV-2 в сыворотках крови животных использовали коммерческий набор реагентов «БиоКит-ИФА» («Биосервис», Россия) согласно инструкции по применению. В качестве иммуносорбента в ИФА использовали нативный вирусный антиген, полученный в зараженной культуре клеток Vero CCL-81. Осветленную центрифугированием и инактивированную УФ-излучением вирусосодержащую культуральную жидкость (45 мл) с титром вируса не менее  $8,0 \text{ Ig TЦД}_{50}/\text{мл}$  пропускали через центрифужный фильтр Amicon MWCO 100 кД («Millipore», Ирландия) при 4000 об/мин. Вирусный препарат, собранный на фильтре, разбавляли до 4,5 мл стерильным ФСБ (рН 7,2), достигая 10-кратной



концентрирования вирионов SARS-CoV-2. Перед использованием препарат обрабатывали в ультразвуковом дезинтеграторе MSE (Великобритания) при амплитуде 2 в течение 2 мин. Полученный вирусный антиген сорбировали в лунках планшета в разведении 1:80 и инкубировали 12 часов при 4°C. По окончании срока инкубации планшет с сорбентом промывали и вносили блокирующий раствор после чего инкубировали 1 час при комнатной температуре. После инкубации жидкость удаляли и трижды промывали планшет раствором для промывки. Перед работой иммуносорбент сушили 2-2,5 часа при комнатной температуре, исключая попадания прямых солнечных лучей на поверхность планшеты. В качестве конъюгатов в зависимости от цели эксперимента использовались мышинные моноклональные антитела к Fc-фрагменту  $\gamma$ -глобулина человека, меченные пероксидазой хрена (Биосервис, Россия) в разведении 1:30000, афинно-очищенные антитела козы, меченные пероксидазой хрена, специфичные к IgG, IgA, IgM мыши (ИМТЕК, Россия) в разведении 1:10000, афинно-очищенные антитела козы, меченные пероксидазой хрена, специфичные к IgG хомячка (Sigma – Aldrich, США) в разведении 1:10000. В качестве порогового уровня использовали значение ОП для отрицательной сыворотки, умноженное на 2. За титр антител к SARS-CoV-2 принимали последнее разведение, при котором значение ОП образца было выше чем порог отсечения.

#### **2.2.27 Определение титра нейтрализующих антител к SARS-CoV-2**

Титр вируснейтрализующих антител (ВНА) к SARS-CoV-2 определяли, как описано в работе Gao Q. с соавт. (2020) [514]. Образцы сывороток аликвотировали по 100 мкл и хранили при температуре -20°C. Перед постановкой реакции нейтрализации (РН) сыворотки размораживали, прогревали при 56°C в течение 30 мин, готовили последовательные двукратные разведения поддерживающей средой. Разведения сывороток смешивали с равным объемом вирусного материала SARS-CoV-2 в титре  $2 \cdot 10^3$  ТЦД<sub>50</sub>/мл и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 1 часа. Из 96-луночного планшета с трехдневным монослоем клеток Vero CCL-81 удаляли среду и вносили в лунки смесь вируса и сыворотки в 4 повторах по 100 мкл (доза вируса - 100 ТЦД<sub>50</sub> на лунку) согласно схеме (Рисунок 17) и инкубировали в течение 5 суток при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Помимо исследуемых образцов, в РН предусматривали следующие контроли: клеточный контроль (КК - незараженная клеточная культура), вирусный контроль (ВК – клетки, зараженные рабочим разведением вируса), контроль сыворотки (КС - сыворотка в разведении 1:20), контроль дозы (КД – пятикратные разведения вируса). Учет результата РН проводили визуально путем микроскопического исследования клеток либо спектрофотометрически в колориметрическом тесте МТТ (метилтиазолилтетразолий бромид). При визуальном учете нейтрализующим титром сыворотки считали обратное значение ее последнего разведения, в котором признаков ЦПД не обнаруживалось в 2 или более лунках. В тесте МТТ учет нейтрализующего титра проводили

спектрофотометрически и считали по последнему разведению, при котором показатель среднего значения ОП530-620 (далее - ОП530) был равен или превышал значения порогового показателя (ПП), определенного по формуле:

$$ПП = \frac{ОП_{530}КК - ОП_{530}ВК}{2}, \text{ где}$$

ОП530КК - среднее значение ОП530 в контрольных лунках с незараженной клеточной культурой (КК); ОП530ВК - среднее значение ОП530 в контрольных лунках, содержащих рабочее разведение вируса (ВК).

Разведение сыворотки	Сыворотка 1				Сыворотка 2				Контроли				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1:20										КД			
1:40													
1:80													
1:160													
1:320									КС-1		КС-2		
1:640									КК		ВК		
1:1280													
1:2560													

КД - контроль дозы, КС-1, КС-2 - контроли сывороток, КК - контроль клеток, ВК - вирусный контроль.

Рисунок 17 - Схема расположения образцов в 96-луночном планшете при постановке РИ

Значения контрольных показателей учитывали следующим образом. КК - клеточный монослой в контрольных лунках должен быть сохранен полностью. ВК – полная дегенерация монослоя клеток в результате ЦПД вируса. Значения ОП530 ВК должны быть не выше 0,20, а отношение ОП530КК/ОП530ВК должно быть не менее 8 [636].

#### 2.2.28 Оценка вирулентности и протективной активности *sa* мутантов SARS-CoV-2

Три группы золотистых сирийских хомячков (далее - хомячки) по 9 голов в каждой заражали (иммунизировали) интраназально штаммом D (17 пассаж), D-B4 и D-D2 в дозе 4,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/голову. Группе негативного контроля (n=9) вводили ФСБ. Ежедневно оценивали состояние животных и каждые 2 дня проводили контроль веса. Через 4 суток после заражения часть животных (по 4 головы из каждой группы) гуманно умерщвляли, извлекали легкие, головной мозг и другие органы, гомогенизировали в среде ДМЕМ (1:1) с гентамицином, центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин при 4°C, отбирали супернатант и хранили при температуре -80°C до исследования. Левое лёгкое хомячков фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 ч, обезвоживали, заливали в парафиновую среду Histomix («BioVitrum», Russia) и использовали для гистологического исследования. В

полученном экстракте из органов определяли титр вируса и концентрацию вирусной РНК. Отсутствие задержки в приросте веса, достоверно более низкий титр вируса и концентрация вирусной РНК в легких и мозге, меньшая распространенность воспалительных изменений в легких по сравнению со штаммом D свидетельствовали о сниженной вирулентности вируса, то есть наличии у него *att* фенотипа. Для оценки протективной активности через 21 день п.и. животных (по 5 голов в группе) интраназально заражали штаммом D в дозе 4,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/голову. Ежедневно оценивали состояние животных и каждые 2 дня проводили контроль веса. Через 4 суток после заражения животных гуманно умерщвляли, извлекали легкие, головной мозг и другие органы и готовили для определения титра вируса, концентрации вирусной РНК и гистологического исследования как описано выше.

### **2.2.29 Гистологическое исследование легких**

Гистологическое исследование легких выполнено в отделении экспериментальной фармакологии и токсикологии МНИОИ им. П.А. Герцена (Панкратов А.А., Трунова Г.В., Хохлова В.А.). Ступенчатые срезы толщиной 3-5 мкм изготавливали на ротационном микротоме Leica RM 2125 RTS («Leica», Германия), затем окрашивали гематоксилином и эозином и заключали в канадский бальзам. Три ступенчатых среза каждого органа исследовали под световым микроскопом ВХ 51 («Olympus», Япония) с системой фоторегистрации материала. На гистологических срезах лёгких хомячков оценивали выраженность патоморфологических изменений по критериям морфологической оценки: доля (%) поражённой площади лёгких; характер распределения очагов пневмонии; повреждение эпителиальной выстилки бронхов и бронхиол; клеточный дебрис в просвете бронхов и бронхиол; бронхит; бронхоинтерстициальная пневмония; интерстициальная пневмония; диффузное повреждение альвеол (некроз альвеолоцитов, клеточный дебрис в просветах альвеол, интраальвеолярное кровоизлияние, интраальвеолярный отёк, интерстициальный отёк, воспалительный инфильтрат в межальвеолярных перегородках); внутриальвеолярные нейтрофилы и макрофаги; васкулит; некроз и десквамация клеток эндотелия сосудов; гиперплазия клеток мерцательного эпителия бронхов; гиперплазия альвеолоцитов II типа согласно рекомендациям Gruber A.D. с соавт. [515]. Проводили фотофиксацию полученных гистологических срезов. Степень патологических изменений в лёгких животных после экспериментального заражения выражали в баллах (от 0 до 3 баллов по каждому из критериев, максимально возможный суммарный балл – 60).

### **2.2.30 Трансмиссивная электронная микроскопия**

Образцы инактивированного ультрафиолетом вирусного материала были нанесены на сетки для ТЭМ с углеродной подложкой (Ted Pella Carbon Type B, 300 mesh) и негативно контрастированы 1% уранилацетатом. Изображения ТЭМ были получены с помощью

электронного микроскопа JEOL JEM-2100 200 кВ, оснащенного камерой Gatan Orius SC200D (2k x 2k).

### **2.2.31 Статистическая обработка данных**

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v.5.03, R-Studio version 1.2.1335 и Microsoft Excel. Результаты определения значений определяемых величин представляли, как среднее (M) и стандартное отклонение (SD) или ошибку среднего (SEM). Достоверность различий в значении параметра между малыми выборками определяли согласно U-критерию Манна-Уитни с 95% доверительным интервалом (ДИ). Достоверной считалась разница при  $p < 0,05$ . Качественную оценку тесноты связи показателей проводили по шкале Чеддока. Статистическую значимость разницы титров антител, учтенных разными методами, оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

При исследовании распространенности ВПЧ качественные признаки представляли в форме доли штаммов ВПЧ разных типов от общего числа штаммов в группе с 95% ДИ. Частоты качественных признаков в группах сравнивались с помощью точного критерия Фишера (The Fisher exact test, two sided). Достоверными считали различия при уровне значимости  $p \leq 0,05$ . При множественных сравнениях учитывалась поправка Бонферрони.

### **2.2.32 Соблюдение требований безопасности при работе с вирусами**

Все работы с вирусами проводились в соответствии с санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Работы с вирусами III-IV групп патогенности проводились в условиях лаборатории, отвечающей требованиям 1-го и 2-го уровней биобезопасности. Работы, связанные с накоплением и использованием штаммов SARS-CoV-2, проводились в условиях лаборатории, отвечающей требованиям 3-го уровня биобезопасности. Сотрудники, работавшие с вирусами, прошли инструктаж по технике безопасности и имели действующее удостоверение о повышении квалификации по программе «Бактериология. Вирусология. Биологическая безопасность», выданное ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

### **2.2.33 Соблюдение этических требований**

Протокол исследования и другие материалы диссертации Файзулоева Е.Б. на соискание ученой степени д.б.н. «Биологическое разнообразие и факторы вирулентности вирусов - возбудителей вакциноуправляемых инфекций» одобрены Локальным Советом по Этике при ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (Протокол заседания №2 от 03.11.2020 г.). В случае поступления клинических образцов из других учреждений, этические заключения на проведенные исследования были получены в учреждениях, на базе которых собирался биоматериал. Исследование разнообразия циркулирующих в московском регионе ротавирусов

одобрено Независимым комитетом по этике при ГБУЗ МО МНИКИ им. М.Ф. Владимирского, на базе которого проводился сбор фекальных образцов от детей, госпитализированных с острым гастроэнтеритом (Протокол заседания №6 от 08.06.2018 г.). Эксперименты на животных были выполнены в соответствии с принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и для других научных целей (Страсбург, 1986) и приказом Министерства Здравоохранения РФ от 23 августа 2010 года № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики».

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 РАЗРАБОТКА МЕТОДОЛОГИИ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1.1 Разработка на основе метода мультиплексной ПЦР-РВ лабораторных тест-систем для дифференциального выявления широкого спектра возбудителей респираторных и кишечных вирусных инфекций

Установление таксономической принадлежности возбудителей острых респираторных и кишечных заболеваний является важной проблемой диагностики и эпидемиологического мониторинга вирусных инфекций. В то же время, современный уровень клинических испытаний специфических противовирусных препаратов и вакцин против возбудителей ОРВИ и ОКИ требует расшифровки случаев вирусных инфекций с учетом всего спектра вероятных возбудителей заболевания. Практическая значимость разрабатываемых в настоящем разделе методических подходов и экспериментальных наборов реагентов заключается в том, что они могут применяться как инструменты научных исследований, диагностики, эпидемиологического мониторинга, а также при проведении доклинических испытаний специфических противовирусных препаратов и вакцин против соответствующих вирусных заболеваний. В контексте настоящей диссертации выполненный раздел работ (п. 3.1) представляет собой разработку методических подходов, необходимых для дальнейшего исследования биоразнообразия ротавирусов, коронавируса и разработки научных основ создания живых аттенуированных вакцин против краснухи и COVID-19.

При упоминании вирусов в настоящей диссертации употребляются их общепринятые названия или сокращенные обозначения вирусов, отличающиеся от наименований таксономических групп, рекомендованных Международным комитетом по таксономии вирусов [516]. Поскольку в таксономии и номенклатуре вирусов за последние годы неоднократно происходили изменения, актуальная таксономическая принадлежность, общепринятые и сокращенные обозначения вирусов, упоминаемых в диссертации, были представлены в отдельной таблице (Приложение А).

Основной тенденцией в развитии метода ПЦР, как инструмента этиологической диагностики и эпидемиологического мониторинга инфекционных заболеваний, является замена традиционной ПЦР с электрофоретической детекцией на ПЦР-РВ, что повышает специфичность анализа, снижая при этом риск контаминации реакционных смесей ампликонами и получения ложноположительных результатов. Важным достоинством метода ПЦР-РВ является возможность дифференциального выявления нескольких вирусов в одной пробирке при условии наличия в реакционной смеси нескольких пар соответствующих праймеров (мультиплексная ПЦР). Формат мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ подходит как для этиологической диагностики острых респираторных и кишечных вирусных инфекций,

отличающихся широким разнообразием возбудителей, так и для субвидовой таксономической характеристики вирусов (например, генотипирования вирусов) [25]. В связи с этим задачу разработки тест-систем для дифференциального выявления широкого спектра возбудителей респираторных и кишечных вирусных инфекций и генотипирования ротавирусов мы решали на основе метода мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ.

Важным достоинством ПЦР-РВ является возможность количественного определения вирусного генома. Таким образом, каждый из подобранных в диссертации наборов праймеров и зондов для ПЦР-РВ или ОТ-ПЦР-РВ может быть использован для определения вирусной нагрузки в биологических образцах [26]. В дальнейших разделах диссертации метод количественной ОТ-ПЦР-РВ использовали при оценке репродуктивной активности ротавирусов, вируса краснухи и SARS-CoV-2 в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

### **3.1.1.1 Разработка тест-системы для дифференциального выявления нуклеиновых кислот 12 групп респираторных вирусов**

#### ***Подбор праймеров и зондов, разработка контрольных образцов, оптимизация условий выявления НК респираторных вирусов методом ОТ-ПЦР-РВ***

С целью определения оптимальных мишеней в геномах респираторных вирусов для праймеров и зондов был проведен анализ научной литературы, посвященной ПЦР-диагностике респираторных вирусных инфекций, и определен спектр основных возбудителей ОРВИ, перечисленных ниже [25].

Представители семейства *Orthomyxoviridae*, отряд *Articulavirales*:

– вирус гриппа А – вид *Alphainfluenzavirus influenza*;

– вирус гриппа В - вид *Betainfluenzavirus influenza*.

Представители семейства *Paramyxoviridae*, отряд *Mononegavirales*:

– вирус парагриппа 1 типа - вид *Respirovirus laryngotracheitidis*, подсемейство *Orthoparamyxovirinae*;

– вирус парагриппа 2 типа - вид *Orthorubulavirus laryngotracheitidis*, подсемейство *Rubulavirinae*;

– вирус парагриппа 3 типа - вид *Respirovirus pneumoniae*, подсемейство *Orthoparamyxovirinae*;

– вирус парагриппа 4 типа (ВПГ-4) - вид *Orthorubulavirus hominis*, подсемейство *Rubulavirinae*.

Респираторно-синцитиальный вирус - вид *Orthopneumovirus hominis*, семейство *Pneumoviridae*, отряд *Mononegavirales*.

Аденовирусы – виды: *Mastadenovirus adami*, *Mastadenovirus faecale*, *Mastadenovirus russelli*, семейство *Adenoviridae*, отряд *Rowavirales*.

Бокавирусы – виды: *Bocaparvovirus primate1*, *Bocaparvovirus primate2*, *Bocaparvovirus primate3*, подсемейство *Parvovirinae*, семейство *Parvoviridae*, отряд *Piccovirales*.

Риновирuсы – виды: *Enterovirus alparhino*, *Enterovirus betarhino*, *Enterovirus cerhino*, подсемейство *Ensavirinae*, семейство *Picornaviridae*, отряд *Picornavirales*.

Энтеровирусы - виды: *Enterovirus alphacoxsackie*, *Enterovirus betacoxsackie*, *Enterovirus coxsackiepol*, подсемейство *Ensavirinae*, семейство *Picornaviridae*, отряд *Picornavirales*.

Коронавирусы (подсемейство *Orthocoronavirinae*, семейство *Coronaviridae*, подотряд *Cornidovirineae*, отряд *Nidovirales*) - HCOV-229E (вид *Alphacoronavirus chicagoense*, подрод *Duvinacovirus*); HCOV- NL63 (вид *Alphacoronavirus amsterdamense*, подрод *Setracovirus*); HCOV- HKU1 (вид *Betacoronavirus hongkongense*, подрод *Embecovirus*); HCOV- OC43 (вид *Betacoronavirus gravedinis*, подрод *Embecovirus*).

Вышеперечисленный список вирусов включает 23 вида патогенных для человека респираторных вирусов, каждый из которых отличается высоким антигенным и генетическим разнообразием. Следовательно, одной из важнейших задач был поиск консервативных участков вирусных геномов в качестве мишеней для диагностических олигонуклеотидов, позволяющих «охватить» все виды респираторных вирусов и максимально возможное количество их генетических вариантов.

Из базы данных GenBank (NCBI) получены нуклеотидные последовательности геномов респираторных вирусов для последующего компьютерного анализа. Учитывая крайне высокую степень антигенного и генетического разнообразия респираторных вирусов, для анализа использовали полногеномные последовательности представителей разных генотипов и серотипов вирусов [25]. Далее проводили множественное выравнивание геномных последовательностей респираторных вирусов в компьютерной программе Vector NTI Advance 9.0 (модуль AlignX) для обнаружения консервативных участков. Диагностические праймеры и зонды направляли к консервативным участкам вирусных геномов. Всего было сконструировано 13 наборов праймеров и зондов для дифференциального выявления 12 групп респираторных вирусов и вируса, используемого в качестве внутреннего положительного контроля (ВПК). Диагностические олигонуклеотиды для выявления АДВ были направлены к L3-гену (ген гексона), БВ – к гену VP1, ВГрВ – к гену М, РСВ -к гену L, РВ – к 5'-NTR, ВПГ-1, ВПГ-2 и ВПГ-3 – к гену HN, ВПГ- 4 –к гену Р, ВГрА - к гену М, ЭВ - к 5'-NTR, КВ - к гену NSP13 (Таблица 12). При подборе последовательностей праймеров и зондов руководствовались правилами, перечисленными в главе 2 «Материалы и методы» (п. 2.2.6) настоящей диссертации [25].



Специфичность подобранных олигонуклеотидов контролировали в реакции моноспецифической ОТ-ПЦР (в реакционной смеси только праймеры) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации, далее - методом ОТ-ПЦР-РВ (в реакционной смеси праймеры и зонд) с использованием в качестве контрольных образцов препаратов гомологичных и гетерологичных респираторных вирусов, представленных в Таблице 6.

В мультиплексной ПЦР возможно неспецифическое взаимодействие праймеров и зондов между собой и с присутствующими в реакционной смеси НК, что приводит к снижению чувствительности анализа [26]. С целью минимизации возможности подобных неспецифических реакций проводили моделирование *in silico* взаимодействия между собой всего набора нуклеотидных последовательностей праймеров и зондов с помощью программы FastPCR. Далее, в серии экспериментов определяли оптимальное распределение праймеров и зондов по реакционным смесям для проведения мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ. При формировании реакционных смесей для мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ были опробованы различные комбинации праймеров и зондов. Одним из основных критериев при выборе оптимальной комбинации праймеров и зондов была эффективность ПЦР, косвенным проявлением которой были значения ПЦ и интенсивность флуоресцентного сигнала [25]. Во всех экспериментах применялась двухэтапная ОТ-ПЦР-РВ - на первом этапе в мультиплексной реакции ОТ получали кДНК, которая на последующем этапе ПЦР-РВ служила матрицей для амплификации. На основе проведенных экспериментов было сформировано четыре реакционные смеси для мультиплексной ОТ и ПЦР-РВ: р.с. №1 – для выявления АДВ, БВ, ВПК; р.с. №2 – ВГрВ, РСВ, РВ; р.с. №3 – ВПГ-1, ВПГ-2, ВПГ-3, ВПГ-4 и р.с. №4 – ВГрА, ЭВ, КВ (Таблица 15). Далее были определены оптимальные концентрации праймеров и зондов для каждой реакционной смеси, а также температурно-временной режим амплификации [25].

Таблица 15 - Распределение праймеров и зондов по реакционным смесям для дифференциального выявления 12 групп респираторных вирусов методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ [25]

Флуоресцентный краситель	Длина волны (макс. поглощения, нм/макс. флуоресценции, нм)	Реакционная смесь			
		1	2	3	4
FAM	490/520	АДВ	-	ВПГ-4	ВГрА
R6G	520/550	-	ВГрВ	ВПГ-3	ЭВ
ROX	580/610	БВ	РСВ	ВПГ-2	КВ
Sy5	645/670	ВПК	РВ	ВПГ-1	-

Первоначальный вариант экспериментального набора реагентов (ЭНР) был предназначен для обнаружения НК десяти групп респираторных вирусов: АДВ, ВГрВ, РСВ, РВ, ВПГ-1, ВПГ-2, ВПГ-3, ВПГ-4, ВГрА и ЭВ, что при анализе выборки клинических образцов (n=493) от пациентов с симптомами ОРВИ позволило выявить респираторные вирусы только в 49% случаев. С целью повышения диагностической эффективности ЭНР была учтена важная роль в этиологии ОРВИ коронавируса человека и открытых в 2005 году бокавирусов [45]. Усовершенствованный компонентами КВ и БВ ЭНР позволил дополнительно выявить РНК КВ в 5,8% (28 из 480), а ДНК БВ – 19,1% (17 из 89) случаев, значительно повысив эффективность расшифровки этиологической структуры ОРВИ.

Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов ЭНР для дифференциального выявления 12 групп респираторных вирусов методом ОТ-ПЦР-РВ (после оптимизации) приведены в Таблице 12.

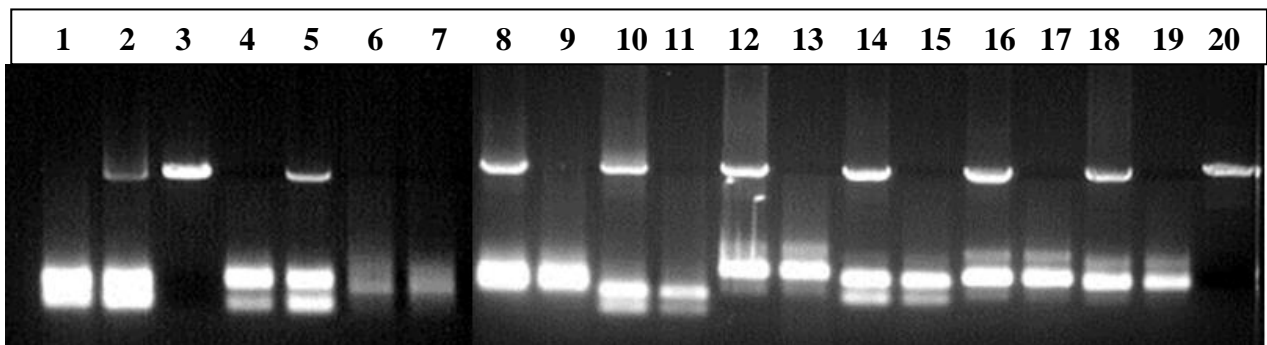
***Приготовление пулов положительных контрольных образцов и контрольных образцов чувствительности***

Поскольку дифференциальное выявление 12 групп респираторных вирусов проводится методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ в 4 реакционных смесях, то и положительные контрольные образцы (ПКО) анализируются в тех же условиях. В связи с этим, первоначально ПКО представляли собой четыре пула образцов лабораторных штаммов респираторных вирусов, разбавленных и смешанных таким образом, чтобы они определялись в мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ на ПЦ 26-32. Однако, использование в качестве ПКО РНК и ДНК, выделенных из вирусосодержащих образцов, имеет ряд недостатков. Например, ПКО на основе вирусной НК не подходят для определения и контроля аналитической чувствительности выявления отдельных респираторных вирусов, поскольку в этих образцах сложно установить концентрацию вирусной НК. В то же время, оценка аналитической чувствительности на основе вирусосодержащих образцов ПКО с известным вирусным титром также не оптимальна, поскольку в них неизвестно соотношение вирионной НК и репликативных форм вирусных НК.

С целью получения образцов вирусных НК с известной концентрацией были получены фрагменты вирусных геномов в составе плазмид или РНК-транскриптов, содержащих сайты связывания с диагностическими праймерами и зондами. В реакции ПЦР для каждого из 12 респираторных вирусов и вируса, используемого в качестве ВПК, были получены ампликоны, содержащие сайты посадки для праймеров и зондов. Полученные ПЦР-продукты встраивали в плазмиду pGEM-T Easy («Promega», США) под контроль промоторов для РНК-полимераз фагов T7 и SP6. Для плазмид с фрагментами геномов ДНК-содержащих АД и БВ, спектрофотометрически определяли концентрацию, готовили 10-кратные разведения и использовали их для приготовления пулов ПКО и контрольных образцов чувствительности

(КОЧ). Плазмиды, несущие фрагменты геномов РНК-содержащих вирусов, использовали для получения транскриптов. Для подтверждения принадлежности вставки соответствующему вирусу была определена нуклеотидная последовательность области вставки, определена ориентация вставки относительно промоторов T7 и SP6 и выбран промотор в зависимости от полярности вирионной РНК соответствующего вируса. В реакции транскрипции были получены фрагменты геномов вирусов ВГрА, ВГрВ, ЭВ, РСВ, РВ, КВ, ВПГ-1, ВПГ-2, ВПГ-3, ВПГ-4, после чего для удаления плазмидной ДНК образцы были обработаны ДНКазой (Рисунок 18). Отдельно был получен транскрипт для ВПК [25].

Каждый транскрипт разбавляли в 100 000 раз водой, свободной от РНКаз и содержащей ролуА (2 мкг/мл), и анализировали в 2 реакциях: ПЦР-РВ и ОТ-ПЦР-РВ. В реакции ОТ-ПЦР-РВ (определение вирусной РНК) значения ПЦ были на 18-27 меньше, чем значения ПЦ в ПЦР-РВ (остаточная плазмидная ДНК), что свидетельствует о высокой эффективности удаления плазмидной ДНК из препаратов транскриптов, а также о высоком качестве самих транскриптов.



1%-й агарозный гель. Дорожки: 1) ЭВ после ДНКазы; 2) ЭВ без ДНКазы; 3) линейризованная плазида перед транскрипцией; 4) РВ 16 после ДНКазы; 5) РВ 16 без ДНКазы; 6) РСВ после ДНКазы; 7) ВПГ-3 после ДНКазы; 8) ВГрА без ДНКазы; 9) ВГрА после ДНКазы; 10) НСоV-ОС-43 без ДНКазы; 11) НСоV-ОС-43 после ДНКазы; 12) ВГрВ без ДНКазы; 13) ВГрВ после ДНКазы; 14) ВПГ-1 без ДНКазы; 15) ВПГ-1 после ДНКазы; 16) ВПГ-2 без ДНКазы; 17) ВПГ-2 после ДНКазы; 18) ВПГ-4 без ДНКазы; 19) ВПГ-4 после ДНКазы; 20) линейризованная плазида перед транскрипцией.

Рисунок 18 - Электрофоретический анализ транскриптов на разных стадиях их получения

Концентрацию транскриптов оценивали спектрофотометрически и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ , а для приготовления разведений и пулов ПКО использовали однократно размороженные аликвоты транскриптов. Транскрипты и плазмиды разводили водой, свободной от нуклеаз и содержащей препарат ролуА в конечной концентрации 2 мкг/мл, таким образом, чтобы концентрация вирусспецифичной НК составляла  $10^6$  и  $10^4$  копий/мл для ПКО и КОЧ, соответственно [25]. Так были получены пулы контрольных образцов для каждого из 12

вирусов. При анализе пулов ПКО в мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ значения ПЦ варьировали в диапазоне 25-30 (Таблица 16), а при анализе КОЧ - 34-37.

Таблица 16 - Описание пулов ПКО экспериментального набора реагентов

№ пула	Транскрипт или плазида	Минимальное и максимальное значение ПЦ, полученное в независимых экспериментах
1	АДВ (плазида)	30-32
	БВ (плазида)	30-32
	ВПК (транскрипт)	28-30
2	ВГрВ (транскрипт)	27-29
	РСВ (транскрипт)	28-30
	РВ (транскрипт)	28-30
3	ВПГ-4 (транскрипт)	26-29
	ВПГ-3 (транскрипт)	28-30
	ВПГ-2 (транскрипт)	28-30
	ВПГ-1 (транскрипт)	27-30
4	ВГрА (транскрипт)	28-30
	ЭВ (транскрипт)	25-27
	НСоV-ОС-43 (транскрипт)	28-30

В процессе разработки набора реагентов использовали отечественные приборы для амплификации в режиме реального времени – АНК-32 и ДТ-96, относящиеся к категории «планшетных» амплификаторов. Кроме того, экспериментальный набор реагентов (ЭНР) был адаптирован для роторного амплификатора Rotor-Gene™ 6000 («Corbett Research», Австралия), который, несмотря на существенные конструктивные особенности, имеет совместимые с разрабатываемым набором реагентов технические характеристики.

***Оценка параметров диагностической эффективности дифференциального выявления возбудителей ОРВИ методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ***

Для проведения лабораторных испытаний ЭНР были сформированы панели клинических образцов от пациентов с симптомами ОРВИ и здоровых лиц, охарактеризованные референсными методами на наличие респираторных вирусов. Сформированные панели клинических образцов (Панели 1-5), использованные для лабораторных испытаний ЭНР, коммерческие наборы реагентов, референсная методика изоляции и идентификации вирусов гриппа в культуре клеток MDCK, применявшиеся в данной работе, описаны в главе 2 «Материалы и методы». Всего ЭНР проанализировано более восьмисот клинических образцов, собранных на территории московского региона в период с 2007 по 2011 гг. от пациентов с симптомами ОРВИ.

На начальных этапах разработки тест-системы был проведен сравнительный анализ панели клинических образцов от пациентов с симптомами ОРВИ (Панель Р1, n=226) ЭНР и

тест-системой сравнения, разработанной в отделе микробиологии Медицинского центра Лейденского университета (LUMC), где она использовалась для рутинной диагностики. ЭНР отличался от референсной тест-системы наличием наборов праймеров для выявления аденовирусов и энтеровирусов и отсутствием возможности выявления метапневмовируса и дифференциального выявления HCoV-NL63, HCoV-229E и HCoV-OC43. Смеси праймеров и зондов и режим амплификации тест-системы сравнения описаны в соответствующих публикациях разработчиков [508; 517]. Сравнительный ОТ-ПЦР-РВ анализ позволил выявить различные респираторные вирусы в 53,1% и 50,4% случаев с помощью разрабатываемой и референсной тест-системы, соответственно. Результаты выявления вирусов, анализ на которые предусмотрен обеими тест-системами (ВГрВ, ВГрА, РСВ, ВПГ-1, ВПГ-2, ВПГ-3, ВПГ-4, РВ, КВ), совпали на 97%. Если рассматривать случаи выявления респираторных вирусов референсной тест-системой как «истинно положительные» результаты, то диагностическая чувствительность ЭНР составила 95,6% (109 совпадений в результатах из 114 выявленных референсной тест-системой). Примечательно, что диагностическая чувствительность выявления ВГрА составила 100%, а ВГрВ – 97% [25].

Дополнительно диагностическую чувствительность выявления методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ вирусов гриппа А и В оценивали в сравнительном анализе 267 клинических образцов от пациентов гриппоподобными симптомами (Панель Р2), охарактеризованных культуральным методом. Носоглоточные смывы, полученные в течение двух эпидемических сезонов (151 образец в сезоне 2008-09 гг. и 116 – в сезоне 2009-10 гг.), поступили на исследование из ЦЭЭГ Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) в зашифрованном виде. РНК вирусов гриппа была выявлена ЭНР в 104 образцах (48 – ВГрА и 56 – ВГрВ), тогда как культуральным методом вирусы гриппа были изолированы из 84 образцов (35 – ВГрА и 49 – ВГрВ). Результаты выявления вирусов гриппа двумя методами совпали на 89,4%. 22 образца, в которых ЭНР были выявлены РНК ВГрА (n=13) и ВГрВ (n=9), в культуральном методе дали отрицательный результат. Наличие РНК соответствующих вирусов было подтверждено методом ОТ-ПЦР-РВ с праймерами и зондами, направленными к другим участкам генома ВГрА (ген NS2) и ВГрВ (ген NP). В четырех образцах, напротив, методом ОТ-ПЦР-РВ был получен отрицательный результат при анализе образцов с положительным результатом культурального метода (2 – ВГрА и 2 – ВГрВ). Если рассматривать культуральный метод в качестве «золотого стандарта» диагностики гриппа, то диагностическая чувствительность метода мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ для ВГрА составила 94,3%, для ВГрВ - 95,9%. (в среднем - 95,2%). В 25 образцах Панели Р2 методом ОТ-ПЦР-РВ были выявлены и другие респираторные вирусы, в результате чего ЭНР позволил обнаружить

различные респираторные вирусы в 47,2 % случаев (n=126), тогда как культуральный метод – в 31,4% (n=84) [521].

При анализе клинических образцов Панели Р3 (n=89) от больных с симптомами ОРВИ в качестве референсных использованы наборы реагентов АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL и АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия). Результаты анализа панели клинических образцов ЭНР и коммерческими наборами совпали на 94,3, при этом выявлено пять несовпадений, связанных с недостаточной чувствительностью одного из наборов реагентов [25].

Кроме тех образцов, которые анализировались референсными методами, с использованием ЭНР были исследованы 233 клинических образца от пациентов с ОРВИ неустановленной этиологии (Панель Р4). В общей сложности ЭНР было проанализировано 815 образцов (Панели Р1, Р2, Р3, Р4) (Таблица 17), при этом для анализа 582 образцов были использованы референсные методы. Важно отметить, что в клинических образцах были выявлены все 12 вирусов, анализ на наличие которых предусмотрен ЭНР. Частота выявления респираторных вирусов в образцах, полученных из различных лечебно-профилактических учреждений, варьировала в широких пределах - от 10 до 84%. Возможным объяснением низкой эффективности расшифровки случаев ОРВИ является несоблюдение правил сбора, хранения и транспортировки клинических образцов, при этом, важнейшим фактором высокой эффективности ПЦР-диагностики ОРВИ являлось ранее взятие клинических образцов – не позднее 3-го дня с момента появления клинических признаков респираторной инфекции.

Таблица 17 - Результаты ОТ-ПЦР-РВ анализа 815 клинических образцов от пациентов с симптомами ОРВИ с использованием ЭНР

Образцы	Отр.	Выявленные вирусы													Смеш.*	Всего
		АДВ	БВ	ВГрА	ВГрВ	ВПГ-1	ВПГ-2	ВПГ-3	ВПГ-4	КВ	РВ	РСВ	ЭВ			
Колич.	390	20	10	90	124	7	12	15	5	23	62	24	9	24	423	
Доля (%)	47,9	2,5	1,2	11,0	15,2	0,9	1,5	1,8	0,6	2,8	7,6	2,9	1,1	2,9	51,9	

\* Случаи смешанной инфекции, в том числе: АДВ/РВ, ВГВ/ВГА, РВ/ВПГ3, РВ/БВ и РВ/КВ - по 2 случая; ВГВ/РСВ, АДВ/ВПГ2, ЭВ/ВПГ4, ВПГ3/ВПГ1, ВГА/КВ, РСВ/КВ, РВ/ВПГ1, ВПГ3/ВПГ4, ВГА/ВПГ1, ВПГ4/РВ, ВГА/РВ, ВПГ3/БВ/РВ, КВ/РВ/БВ, ВГА/БВ – по 1 случаю.

С целью определения диагностической чувствительности набора реагентов были рассмотрены результаты исследования 582 клинических образцов, анализированных референсным набором реагентов и/или методом. Оценка диагностической чувствительности

ЭНР произведена в отношении всех анализируемых вирусов (Таблица 18) кроме ЭВ, поскольку его выявление не предусмотрено ни одним из использованных референсных методов. Общая диагностическая чувствительность по 11 вирусам составила 96,7% [25].

Таблица 18 - Расчет диагностической чувствительности ЭНР

Вирус	Положительных результатов ЭНР от числа положительных результатов референсного метода
ВГрВ	108 - 112
ВГрА	74 - 76
РВ	22 - 25
РСВ	5 - 5
КВ	13 - 13
АДВ	6 - 6
БВ	11 - 11
ВПГ-1	3 - 3
ВПГ-2	8 - 8
ВПГ-3	4 - 4
ВПГ-4	3 - 3
Сумма по 11 вирусам	266 - 275
Расчет общей диагностическая чувствительности	$266 / 275 * 100\% = 96,7\%$

Диагностическая специфичность ЭНР, оцененная на образцах Панели Р5 (n=20) от условно здоровых людей без симптомов ОРВИ, составила 99,2%. Только в двух образцах выявлено низкое содержание ДНК АДВ (значение ПЦ 36,6) и РНК РВ (значение ПЦ 37,2).

Воспроизводимость выявления различных респираторных вирусов, оцененная на отдельной панели клинических образцов (n=35), содержащих все анализируемые набором реагентов вирусы и отрицательные пробы, составила 98,1%.

Таким образом, в результате проведенных лабораторных испытаний была показана высокая диагностическая ценность ЭНР. Диагностическая чувствительность составила – 96,7%, диагностическая специфичность – 99,2% и воспроизводимость – 98,1% [25].

В результате был разработан набор реагентов для дифференциального выявления методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ НК широкого спектра респираторных вирусов. Способ дифференциальной диагностики ОРВИ и нуклеотидные последовательности праймеров и зондов защищены патентом РФ № RU 2460803 «Способ дифференциальной диагностики респираторных вирусных инфекций методом мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени и перечень последовательностей для его осуществления» [20]. На набор реагентов, получивший название «ОРВИ-Монитор», подготовлен проект нормативно-технической документации, регламентирующий процессы изготовления и применения набора реагентов, включающий технические условия (ТУ) и инструкцию по применению набора.

Набор «ОРВИ-Монитор» приказом Росздравнадзора от 19 марта 2012 года № 1211-Пр/12 разрешен к производству, продаже и применению на территории РФ (регистрационное удостоверение № ФСР 2012/13218) (Приложение Б) [25].

### **3.1.1.2 Разработка тест-системы для дифференциального выявления нуклеиновых кислот основных возбудителей кишечных вирусных инфекций**

#### ***Подбор праймеров и зондов, оптимизация условий дифференциального выявления НК кишечных вирусов методом ОТ-ПЦР-РВ, разработка контрольных образцов***

В базах данных GenBank и EMBL был проведен поиск полноразмерных геномов 11 групп кишечных вирусов человека: АДВ, ЭВ, ПВ, ВГА, ВГЕ, НВ, СВ, АВ, ОРВ и отдельных генных сегментов РВА и РВС. На первом этапе проводили множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей полноразмерных вирусных геномов с целью обнаружения наиболее консервативных генов. Далее для каждого из вирусов отдельно проводили множественное выравнивание выбранных генов. К консервативным участкам вирусных геномов были подобраны последовательности праймеров и зондов для выявления ДНК или РНК 11 групп кишечных вирусов человека. При подборе последовательностей праймеров и зондов руководствовались правилами, перечисленными в главе 2 «Материалы и методы» (п. 2.2.6) настоящей диссертации.

Для подбора диагностических праймеров и зонда для выявления ДНК аденовирусов человека проводили множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей гена гексона известных на момент проведения исследования типов АДВ, патогенных для человека, относящихся к видам *Mastadenovirus adami*, *Mastadenovirus faecale*, *Mastadenovirus russelli* (семейство *Adenoviridae*, отряд *Rowavirales*). Известно, что основными возбудителями эпидемического гастроэнтерита являются АДВ 40 и 41 типа (вид *Mastadenovirus faecale*). Однако, в фекальных образцах человека на фоне острых кишечных инфекций часто обнаруживаются представители и других видов АДВ человека, что не позволяет исключить их из списка потенциальных возбудителей ОГЭ. В связи с этим подбор праймеров и зонда проводили с использованием последовательностей геномов представителей всех известных видов АДВ человека.

При подборе диагностических праймеров и зонда для выявления РНК энтеровирусов человека (виды *Enterovirus alphacoxsackie*, *Enterovirus betacoxsackie*, *Enterovirus coxsackiepol*, подсемейство *Ensavirinae*, семейство *Picornaviridae*, отряд *Picornavirales*) проводили множественное выравнивание полноразмерных геномных последовательностей ЭВ, относящихся к разным серотипам. Для проведения множественного выравнивания в базе данных GenBank было отобрано 116 полногеномных последовательностей всех известных на



момент исследования серотипов эховирусов, вирусов Коксаки А и В, полиовирусов и неклассифицированных энтеровирусов. В качестве мишени для праймеров и зонда выбран 5'-НТР генома ЭВ, который является консервативным для всех представителей рода *Enterovirus*. Назначение подобранных праймеров и зонда - выявление максимально возможного количества патогенных для человека типов ЭВ, включая ПВ.

Поскольку диагностические олигонуклеотиды для выявления энтеровирусов выявляют в том числе и полиовирусы серотипов PV-1, PV-2 и PV-3 (вид *Enterovirus coxsackiepol*), перед нами стояла задача дизайна отдельного набора олигонуклеотидов для выявления только полиовирусов. Праймеры и зонд для выявления ПВ были направлены к гену белка VP1, что позволило дифференцировать их от других представителей рода *Enterovirus*. Множественное выравнивание полноразмерных геномов ЭВ показало, что ПВ очень близки к вирусам Коксаки А 13, 18 и 20 серотипов, поэтому особое внимание было уделено исключению возможных перекрестных реакций с этими вирусами. Высокоспецифичное выявление ПВ было достигнуто выбором в качестве мишени для олигонуклеотидов гена белка VP1, а не 5'-НТР, как для ЭВ. Подбор праймеров и зонда проводили на основе множественного выравнивания 73 геномных последовательностей ПВ, относящихся к трем серотипам, а также 6 геномов вирусов Коксаки А 13, 18 и 20 типов (по 2 генома каждого из типов).

При подборе диагностических праймеров и зонда для выявления и идентификации орторевовирусов млекопитающих (вид *Orthoreovirus mammalis*, семейство *Spinareoviridae*, отряд *Reovirales*) использовали 10 геномных последовательностей ОРВ, относящихся к трем известным серотипам. В качестве мишени для диагностических олигонуклеотидов выбран сегмент L3 генома ОРВ, кодирующий минорный коровый белок λ3.

При подборе диагностических праймеров и зонда для выявления и идентификации вируса гепатита А (вид: *Hepatovirus ahepa*, подсемейство *Heptrevirinae*, семейство *Picornaviridae*) использовано 72 геномных последовательности ВГА. На первом этапе было проведено сравнение 27 полноразмерных вирусных геномов, на основе которого в качестве гена-мишени была выбрана последовательность, кодирующая вирусный белок 2С. Далее было проведено множественное выравнивание 45 фрагментов генома, кодирующих белок 2С, на основе которого подобраны праймеры и зонд.

При подборе диагностических праймеров и зонда для выявления и идентификации ротавирусов группы А (вид: *Rotavirus alphagastroenteritidis*, семейство *Sedoreoviridae*, отряд *Reovirales*) было проанализировано более 350 геномных последовательностей РВА, выявленных у пациентов с ОГЭ. Из 11 сегментов ротавирусного генома в качестве мишени для ПЦР-диагностики выбран сегмент 10 (кодирует белок NSP4), имеющий консервативные для всех представителей РВА участки.

При подборе праймеров и зонда для выявления ротавирусов С (вид: *Rotavirus tritogastroenteritidis*, семейство *Sedoreoviridae*, отряд *Reovirales*) в качестве мишени использовали 49 нуклеотидных последовательностей сегмента 8, кодирующего белок VP7.

При подборе диагностических праймеров и зонда для выявления и идентификации норовирусов (вид *Norovirus norwalkense*, семейство *Caliciviridae*, отряд *Picornavirales*) было проанализировано 79 геномных последовательностей НВ человека. Из 5 известных геногрупп НВ наиболее частыми возбудителями ОГЭ у человека являются представители первой (GI) и второй геногрупп (GII). В связи с этим, подбор диагностических олигонуклеотидов проводили таким образом, чтобы обеспечить выявление НВ, относящихся к GI и GII. Важно отметить, что большинство описанных в научной литературе ПЦР тест-систем направлены именно на выявление НВ GII.

Праймеры и зонды для выявления и идентификации саповирусов (вид *Sapovirus sapporoense*, семейство *Caliciviridae*, отряд *Picornavirales*) были направлены к ORF1. Для проведения множественного выравнивания было использовано 25 геномных последовательностей СВ, выделенных от человека. При выборе сайтов связывания с праймерами и зондом особое внимание было уделено исключению возможной перекрестной реактивности по отношению к норовирусам человека, также относящимся к семейству *Caliciviridae*.

При подборе диагностических праймеров и зонда для выявления и идентификации астровирусов (вид *Mamastrovirus hominis*, семейство *Astroviridae*, отряд *Stellavirales*) были использованы 19 полноразмерных нуклеотидных последовательностей ORF2, относящихся к 8 серотипам АВ, выделенных от человека.

Олигонуклеотиды для выявления вируса гепатита Е (вид *Paslahepevirus balayani*, подсемейство *Orthohepevirinae*, семейство *Hepeviridae*, отряд *Hepelivirales*) были подобраны на основе множественного выравнивания геномов представителей четырех генотипов вируса. Для выбора мишени было проанализировано 23 полноразмерных генома ВГЕ, выделенных от человека. В качестве гена-мишени был выбран консервативный участок ORF1. При подборе праймеров также использовали множественное выравнивание геномов ВГЕ свиней, который может передаваться человеку и вызывать у него заболевание.

В качестве ВПК был выбран вирус парагриппа 2 типа (вид: *Orthorubulavirus laryngotracheitidis*, подсемейство *Rubulavirinae*, семейство *Paramyxoviridae*). При выборе ВПГ-2 руководствовались тем, что этот вирус относится к семейству, не содержащему возбудителей ОГЭ, является РНК-содержащим, эффективно размножается в культуре клеток Vero и имеется в рабочей коллекции вирусов лаборатории. Праймеры и зонд были подобраны к гену гемагглютинин-нейраминидазы ВПГ-2.

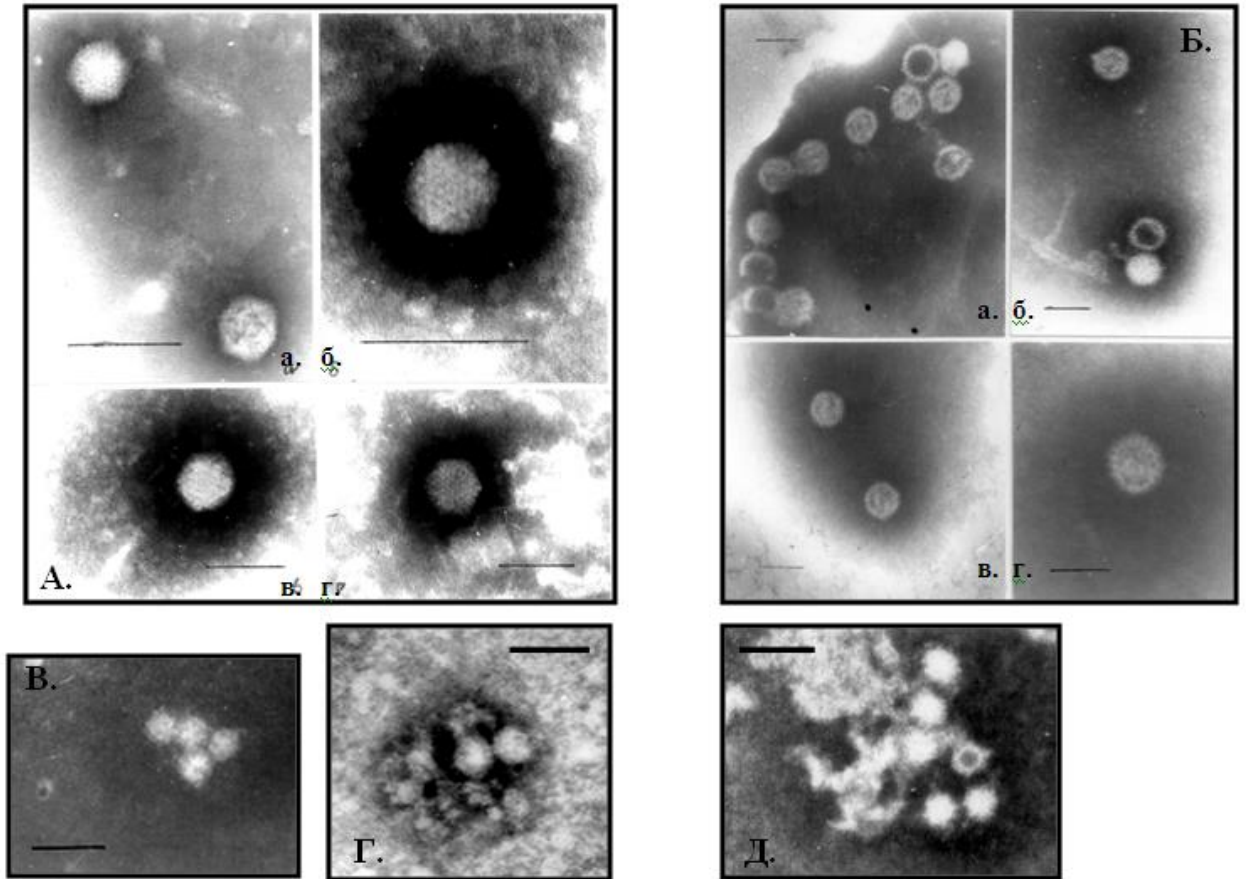
Специфичность всех праймеров была подтверждена в моноспецифической ОТ-ПЦР-РВ с контролем электрофоретической подвижности ампликонов с использованием в качестве контрольных образцов разведений лабораторных штаммов вирусов, изолятов кишечных вирусов, а также охарактеризованных клинических образцов. Получение вирусосодержащих клинических образцов было особенно актуально для вирусов, с трудом поддающихся культивированию, таких как НВ, СВ, АВ, ОРВ и РВС. Для подтверждения таксономической принадлежности кишечных вирусов, присутствующих в клинических образцах, проводили секвенирование фрагментов геномов перечисленных вирусов. Из клинических образцов, содержащих НК указанных вирусов, выделяли РНК, с использованием специально подобранных праймеров получали ПЦР-продукты размером ~400 п.н. и секвенировали их. Полученные нуклеотидные последовательности с помощью интернет-программы BLAST (NCBI) были распознаны как фрагменты генов соответствующих вирусов. Для оценки специфичности олигонуклеотидов к некультивируемым кишечным вирусам использовали также клинические образцы, в которых был обнаружен антиген РВА либо IgM к ВГА или ВГЕ в сыворотке крови. Образцы, содержащие антиген ВГА и ВГЕ, были дополнительно охарактеризованы генотипированием выявленных вирусов, для чего проводили секвенирование фрагмента вирусного генома. Для верификации результатов выявления в клинических образцах АДВ, РВА, НВ и АВ применяли также коммерческую тест-систему АмплиСенс® ОКИ скрин-FL («Интерлабсервис», Россия).

Одним из референсных методов, подтверждающих специфичность ЭНР в отношении некоторых труднокультивируемых (АДВ, РВА и ВГА) и некультивируемых вирусов (НВ и АВ), была ТЭМ. Для ТЭМ подбирали клинические образцы, в которых вирусная НК определилась в ОТ-ПЦР-РВ со значениями ПЦ ниже 20, что свидетельствовало о высоком содержании вируса в образце. Методом ТЭМ было проанализировано 5 фекальных экстрактов, содержащих ДНК АДВ и РНК РВА, НВ, АВ, ВГА (Рисунок 19). Во всех пяти исследованных образцах были обнаружены вирусоподобные частицы, соответствующие по размеру и морфологии выявленным в этих образцах вирусам.

Кроме того, для оценки специфичности праймеров и зондов для обнаружения ЭВ и ПВ использовали репрезентативную панель клинических образцов, содержащих клинически значимые серотипы ЭВ и ПВ (Панель К1, n=39). Образцы Панели К1 анализировали в моноспецифической ОТ-ПЦР-РВ с наборами праймеров и зондов для выявления ЭВ и ПВ. Праймеры и зонды для ЭВ выявляли РНК всех представителей рода *Enterovirus*, тогда как набор олигонуклеотидов для ПВ выявлял только РНК ПВ трех серотипов, но не РНК ЭВ.

Далее в серии экспериментов были определены оптимальные комбинации праймеров и зондов в реакционных смесях для мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ и другие условия проведения

теста - температурно-временной режим проведения реакций ОТ и ПЦР-РВ, концентрация праймеров и зондов, оптимизированы последовательности праймеров для ОТ. Одним из основных показателей, учитываемых при определении оптимальных условий проведения теста, была эффективность ОТ-ПЦР-РВ, косвенным отражением которой являлись значения ПЦ.



А. Аденовирус: а) увеличение 300000х; б) 450000х; в, г) 200000х. Масштабная линейка соответствует 100 нм. Б. Ротавирус А: а, б, в) увеличение 270000х г) 280000х. В. Астровирус, увеличение 270000х. Г. Норовирус, увеличение 270000х. Д. Вирус гепатита А, увеличение 270000х. Для рисунков Б-Д масштабная линейка соответствует 50 нм. ТЭМ выполнена к.б.н. Лотте В.Д., ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

Рисунок 19 - Трансмиссивная электронная микроскопия образцов фекальных экстрактов от детей с ОГЭ

Далее были синтезированы вирусоспецифичные олигодезоксинуклеотиды и изготовлена экспериментальная серия набора реагентов для выявления 11 кишечных вирусов в присутствии ВПК методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ, состоящая из праймеров и зондов, меченных различными флуоресцентными красителями, реакционных смесей для постановки реакций ОТ и ПЦР-РВ, контрольных образцов (ПКО и ОКО) и ферментов (обратной транскриптазы MMLV и Hot-start Taq ДНК-полимеразы с антителами, ингибирующими активность фермента). Изготовленному ЭНР было присвоено рабочее название «ОКИ-Монитор», составлен проект

инструкции на набор в соответствии с «Методическими рекомендациями по подготовке документов для регистрации изделий медицинского назначения» (2008) [522].

Диагностическую эффективность ЭНР оценивали в ходе проведения его лабораторных испытаний на панелях лабораторных штаммов и охарактеризованных клинических образцов. Результаты лабораторных испытаний ЭНР показали, что ряд вирусов (РВА, ПВ, РВС и ВГА) выявляются при анализе в формате мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ с меньшей чувствительностью, чем в формате моноспецифической реакции. Кроме того, для некоторых вирусов было отмечено снижение интенсивности роста сигнала флуоресценции при анализе в мультиплексной ПЦР-РВ образцов с низким содержанием вируса, что затрудняло интерпретацию результатов анализа.

Для решения данной проблемы было подобрано 20 новых вариантов праймеров для этапов ПЦР и ОТ, направленных к другому участку вирусного генома. Новые праймеры были проверены в различных комбинациях в мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ на отдельных вирусодержащих клинических образцах в сравнении с исходными праймерами. По результатам этих экспериментов для дальнейшей работы выбирали праймеры в соответствии с такими критериями, как отсутствие ложноотрицательных результатов при анализе клинических образцов; стабильность или снижение значений ПЦ, полученных при анализе контрольных образцов в сравнении с исходными праймерами; высокая эффективность «разгорания» флуоресцентного сигнала в сравнении с исходными олигонуклеотидами; отсутствие неспецифических продуктов ПЦР при анализе ампликонов методом электрофореза. Кроме того, для минимизации неспецифических взаимодействий олигонуклеотидов и повышения чувствительности теста была сформирована 4-я р.с., в которую из других смесей были вынесены компоненты для выявления РНК ВГА, ВГЕ и ПВ (Таблица 19).

Таблица 19 - Распределение вирусоспецифичных праймеров и зондов по реакционным смесям в мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ

Флуоресцентный краситель	Реакционная смесь			
	1	2	3	4
FAM	АДВ	РВА	СВ	-
R6G	ЭВ	НВ	-	ПВ
ROX	ВПК	АВ	ОРВ	ВГЕ
Cy5	-	-	РВС	ВГА

Проведение анализа в четырех реакционных смесях позволило снизить неспецифические взаимодействия между олигонуклеотидами и достигнуть сопоставимой чувствительности выявления вирусной НК в мультиплексной реакции ОТ-ПЦР-РВ по сравнению с

моноспецифической. В то же время это дало возможность разделить тест-систему на 2 части – для выявления вирусов - возбудителей ОГЭ (р.с. 1, 2, 3), и вирусов энтеральных гепатитов и вируса полиомиелита (р.с. 4). Таким образом, становятся более гибкими потребительские качества набора реагентов, и появляется возможность выпуска тест-системы в двух комплектациях – для анализа образцов воды на наличие маркеров вирусного загрязнения (р.с. 1, 2, 3, 4), и для этиологической диагностики ОГЭ и расшифровки вспышек острых кишечных вирусных инфекций (р.с. 1, 2, 3).

Нуклеотидные последовательности диагностических праймеров и зондов приведены в Таблице 13, а также в патенте РФ № RU2506317 С2 «Способ выявления кишечных вирусов в клинических образцах и воде методом мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени и перечень последовательностей для его осуществления» [21].

На начальных этапах работы в качестве ПКО использовали препараты НК, выделенной из культуральных или клинических вирусосодержащих образцов. Однако для контроля аналитической чувствительности выявления отдельных кишечных вирусов клинические образцы не подходят, поскольку в них сложно установить концентрацию вирусной НК. Задача получения препаратов ПКО и КОЧ для ЭНР была решена путем создания серии плазмид, содержащих фрагменты вирусных геномов, включающих сайты связывания с праймерами и зондами. Для ДНК-содержащего АДВ роль контрольного образца выполняет сама рекомбинантная плазида, тогда как для РНК-содержащих вирусов требовалось получение на основе плазмид РНК-транскриптов. Для получения ПКО фрагменты вирусных НК, полученных методом ОТ-ПЦР, клонировали в плазмиде pGEM-T Easy («Promega», США), содержащей промоторы для РНК-полимераз фагов T7 и SP6 («Promega»), и нарабатывали в виде РНК-транскрипта. Выбор промотора делали таким образом, чтобы получаемый транскрипт соответствовал по полярности геномной РНК вируса. В реакции транскрипции были получены фрагменты геномов ВГА, ВГЕ, ПВ, РВС, РВА, НВ, АВ, СВ, ОРВ и обработаны ДНКазой, не содержащей РНКаз. Концентрацию транскриптов оценивали спектрофотометрически и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  [522].

Каждый транскрипт разбавляли в  $10^5$  раз водой, свободной от РНКаз, и анализировали в реакциях ПЦР-РВ и ОТ-ПЦР-РВ. В Таблице 20 представлены результаты выявления РНК-транскриптов и остаточной плазмидной ДНК, согласно которым транскрипты определились со значениями ПЦ от 14,5 до 21. Как видно из Таблицы 20, разница в значениях ПЦ, полученных в реакции ОТ-ПЦР-РВ и ПЦР-РВ, варьирует для разных транскриптов от 11 до 30,5 (в среднем  $18,9 \pm 5,6$ ), что свидетельствует о высоком содержании в препарате РНК, тогда как доступная для ПЦР остаточная ДНК присутствует в концентрациях на несколько порядков меньших. Для приготовления пулов ПКО и КОЧ использовали однократно размороженные аликваты транскриптов, разводили их водой, свободной от нуклеаз и содержащей препарат polyA (2

мкг/мл), таким образом, чтобы концентрация вирусспецифичной НК составляла  $10^6$  и  $10^4$  копий/мл для ПКО и КОЧ, соответственно.

Опытные серии набора реагентов были произведены ЗАО «Синтол», г. Москва в двух комплектациях, которым были присвоены названия «ОКИ-Монитор Стандарт» и «ОКИ-Монитор Плюс». Совместно со специалистами ЗАО «Синтол» были разработаны проекты нормативно-технической документации – проект инструкции и проект технических условий на набор реагентов «ОКИ-Монитор». Требуемые по регламенту медицинские испытания были проведены на базе лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» РАМН. Набор реагентов «ОКИ-Монитор» адаптирован для проведения анализа на приборах ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия) и Rotor-Gene™ 6000 («Corbett Research», Австралия).

Таблица 20 - Результаты выявления транскриптов в реакции ОТ-ПЦР-РВ

Анализируемый транскрипт (разведение $10^{-5}$ )	ОТ-ПЦР-РВ, значение ПЦ	ПЦР-РВ, значение ПЦ	Разница в значениях ПЦ (ПЦР-РВ минус ОТ-ПЦР-РВ)
РВА	17,0	40,8	23,8
НВ	19,2	35,7	16,5
АВ	18,7	35,3	16,6
СВ	19,0	30,4	11,4
ОРВ	18,1	31,6	13,5
РВС	16,5	33,5	17
ВГА	21,4	38,4	17
ВГЕ	14,5	38,3	23,8
ПВ	14,5	$\geq 45$	$\geq 30,5$
Среднее значение $\pm$ SD	17,7 $\pm$ 2,1	36,6 $\pm$ 4,3	18,9 $\pm$ 5,6

***Оценка диагностической эффективности дифференциального выявления кишечных вирусов методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ***

Диагностическую эффективность набора реагентов «ОКИ-Монитор» оценивали с использованием зашифрованных панелей охарактеризованных вирусосодержащих образцов, в том числе:

– Панель К2 (n=130) - культуральные изоляты АДВ и ЭВ, относящиеся к разным видам и серотипам;

– Панель К3 (n=45) - биологические образцы (преимущественно фекальные), содержащие ВГЕ и ВГА разных генотипов;

– образцы, полученные методом случайной выборки из образцов из Панели К4 (n=160) - клинические образцы от детей в возрасте до 5 лет с диагнозом ОГЭ, охарактеризованные референсным коммерческим набором реагентов «АмплиСенс ОКИ скрин-FL»;

– Панель К6 (n=42) - образцы фекалий от условно здоровых детей в возрасте до 5 лет.

По совокупности охарактеризованных на наличие разных вирусов образцов (клинических и культуральных) чувствительность ЭНР составила 98,8% (Таблица 21) - 245 совпадений с результатом референсного метода из 248 вирусосодержащих образцов [522].

Таблица 21 - Выявление кишечных вирусов в клинических и культуральных образцах ЭНР по сравнению с референсными методами

Вирус	Выявлено ЛНР, случаев	Выявлено референсными методами, случаев		Количество совпадений с референсными методами	Доля совпадений с результатом референсного метода
		ОТ-ПЦР-РВ	Немолекулярные методы*		
РВА	70	70	н/а	70	100
АДВ	49	48	44	48	100
ЭВ	81	н/а	72	72	100
НВ	19	19	н/а	19	100
АВ	1	1	н/а	1	100
СВ	5	н/а	н/а	–	–
ОРВ	1	н/а	н/а	–	–
РВС	1	н/а	н/а	–	–
ВГЕ	8	9	н/а	8	88,9
ВГА	24	26	н/а	24	92,3
ПВ	3	н/а	3	3	100
Чувствительность ЭНР по совокупности охарактеризованных образцов					98,8%

\* иммунохимические, серологические и культуральные методы  
н/а - не анализировали

В результате анализа панели образцов от условно здоровых детей в четырех случаях была выявлена вирусная НК - в двух случаях ДНК АДВ (значения ПЦ 25,0 и 30,0), и в двух случаях РНК СВ (ПЦ 23,3 и 27,3). Диагностическая специфичность ЭНР, рассчитанная на основе результатов выявления 11 групп кишечных вирусов, составила 99,1%. Важно отметить, что кишечные вирусы часто обнаруживают в фекалиях детей без клинических признаков заболевания [518; 519]. Выявление высокого уровня НК АДВ и СВ в фекалиях может относиться к описанным в литературе случаям бессимптомного носительства кишечных вирусов [520]. Возможность выделения вируса с фекалиями в отсутствие симптомов приводит при диагностике заболевания к путанице, когда выявленный потенциальный этиологический агент является последствием ранее перенесенного ОГЭ или бессимптомно протекающей



инфекции, либо перенесенной ОРВИ, когда респираторный вирус заглатывается пациентом, преодолевает желудочно-кишечный тракт и его следы обнаруживаются в кале.

Важно отметить, что в подавляющем большинстве случаев ОКИ вирусной этиологии методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ был выявлен один вирус. Смешанная вирусная инфекция была выявлена в 12,1% случаев и представлена в основном сочетаниями из двух вирусов разных семейств или филогенетически отдаленных групп, что свидетельствует о том, что полученный результат не является следствием неспецифического связывания праймеров и зондов с НК родственных вирусов.

В общей сложности ЭНР «ОКИ-Монитор» исследовано 697 клинических образцов от пациентов с симптомами ОГЭ, из которых в 499 были выявлены НК кишечных вирусов, что составляет 71,6 %. У детей, госпитализированных в стационар с водянистой диареей, характерной для энтерита вирусной этиологии, кишечные вирусы были обнаружены в 89,6%. При этом в период сезонного подъема заболеваемости (зима) вирусная этиология водянистой диареи была подтверждена у 93,3% обследованных, а летом – у 76,9%.

### **3.1.1.3 Участие в международной программе контроля качества молекулярной диагностики QCMD**

После завершения лабораторных испытаний ЭНР «ОРВИ-Монитор» и «ОКИ-Монитор» был проведён внешний контроль качества диагностических исследований. Для этого в компании QCMD (Великобритания) были приобретены 7 контрольных панелей зашифрованных образцов респираторных и кишечных вирусов. QCMD является некоммерческой организацией со штаб-квартирой в Великобритании (основана в 2000 году), целями которой является улучшение качества молекулярной диагностики путем проведения программ внешней оценки качества (External Quality Assessment, EQA) и подтверждения квалификации (Proficiency Testing, PT), а также других программ оценки качества. Деятельность QCMD поддерживается Европейским обществом клинической вирусологии (European Society of Clinical Virology, ESCV), Европейским обществом клинической микробиологии и инфекционных болезней (European Society for Clinical Microbiology & Infectious Diseases, ESCMID) и сертифицирована по Системе менеджмента качества в соответствии со стандартом ISO9001: 2000 [25].

Из QCMD было получено семь зашифрованных панелей респираторных и кишечных вирусов (2010 г.) – от 8 до 12 образцов в каждой панели.

1. Influenza virus A & B (INFRNA10);
2. Human Metapneumovirus & RSV (MPV.RSV10);
3. Parainfluenza virus (PINFRNA10);
4. Rhinovirus & Coronavirus (RV.CVRNA10);
5. Adenovirus DNA (ADVDNA10);

6. Norovirus RNA (NVRNA10);
7. Enterovirus/Parechovirus RNA (EV.RNA10).

В состав панелей входили охарактеризованные образцы, содержащие респираторные и кишечные вирусы различных видов и типов, включая образцы как со средним, так и низким содержанием вирусных НК. Из образцов панелей были выделены НК и проанализированы ЭНР «ОРВИ-Монитор» и «ОКИ-Монитор», результаты анализа оформлены в соответствии с требованиями и отправлены в QCMD для сверки [25].

Сверка данных, полученных при анализе зашифрованных образцов QCMD, показала, что чувствительность выявления образцов со статусом «основной» (core) составила 100% для всех панелей, кроме NVRNA10 (не удалось выявить один «основной» (core) образец из 7 с генотипом GI.3). В целом результаты исследования образцов панелей совпали с данными QCMD на 87%. Несовпадения с данными QCMD связаны в основном с образцами, имеющими статус «редко выявляемые» (с низким содержанием вируса). Так, например, в панели Adenovirus (ADVDNA10) ДНК аденовирусов не определилась в образцах ADV10-01 и ADV10-02 с очень низким содержанием вируса - 447 ГЭ/мл и 113 ГЭ/мл соответственно (значения ниже предела аналитической чувствительности, указанного для аденовирусов в инструкции к набору «ОКИ-Монитор» -  $5 \times 10^3$  ГЭ/мл). В то же время, в образце ADV10-04 с концентрацией 767 ГЭ/мл аденовирусная ДНК обнаружена. В целом результаты участия в программах внешнего контроля качества QCMD можно признать удовлетворительными. Сертификат участника программ QCMD представлен на Рисунке 20 [25].

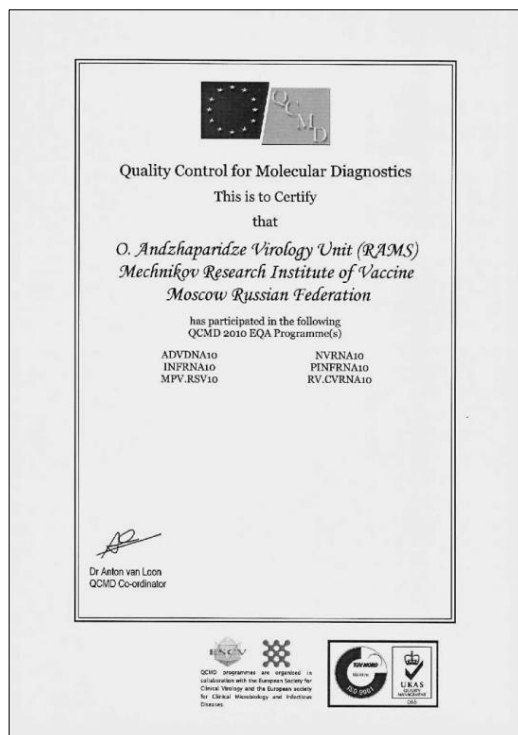


Рисунок 20. Сертификат участника программ внешнего контроля качества QCMD

ПЦР-тест-системы для дифференциальной диагностики респираторных и кишечных вирусных инфекций разработаны в рамках реализации ФЦП «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009 – 2013 гг.)», ОКР «Фарма» (государственный контракт от 22 июля 2009 г. № 9411.1007500.13.979).

*Материалы раздела 3.1.1 опубликованы [521–526].*

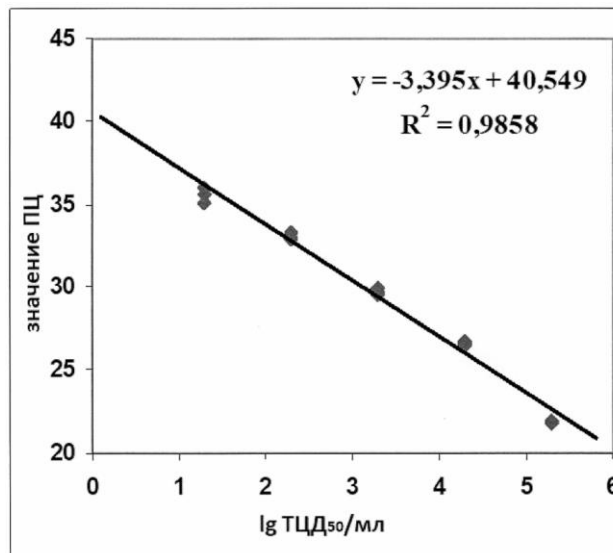
### **3.1.2 Оптимизация условий количественного определения вируса краснухи методом ОТ-ПЦР-РВ**

Одной из проблем разработки и производства вакцины против краснухи является отсутствие экспресс-методов для оценки титра вируса в процессе культивирования для определения времени сбора вирусного материала. Титр вируса краснухи в культуральной жидкости традиционно оценивается в чувствительных культурах клеток в реакции бляшкообразования или титрованием по конечной точке ЦПД. Культуральные методы длительны, трудоемки, сложны в стандартизации и зависимы от внешних факторов. Так, время инкубации клеток при титровании вируса краснухи достигает 12 суток. Еще более сложной задачей является определение специфической активности вируса для поливалентных вакцинных препаратов, что требует дополнительного использования нейтрализующих антител для каждого компонента вакцины. Одним из показателей интенсивности вирусной репродукции является накопление в зараженной культуре клеток вирусных НК. Для оболочечных вирусов, таких как вирус краснухи, содержание вирусной РНК в культуральной жидкости должно отражать накопление инфекционного вируса, поскольку зрелый вирус «отпочковывается» из зараженных клеток в культуральную жидкость. Однако, вопрос о корреляции накопления вирусных НК с интенсивностью вирусной репродукции остается малоизученным. В связи с этим целью данного раздела являлась разработка условий количественного определения вируса краснухи методом ОТ-ПЦР-РВ [22].

К консервативным участкам генома вируса краснухи были подобраны праймеры и флуоресцентно-меченный зонд (Таблица 10). Специфичность олигонуклеотидов подтверждали в реакции ОТ-ПЦР-РВ с РНК, выделенной из штаммов вируса краснухи Wistar RA27/3 и С-77. 10-кратные разведения штамма Wistar RA27/3 с титром  $6,3 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$  были проанализированы методом ОТ-ПЦР-РВ, что позволило оценить аналитическую чувствительность теста в  $20 \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ . На основе полученных значений ПЦ был построен калибровочный график (Рисунок 21), отражающий зависимость ПЦ от титра вируса, на основе которого определяли результат, выраженный в  $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ . Коэффициент детерминации ( $R^2$ ) графика был близок к 1,0, что отражает точную  $\log$ -линейную зависимость значений ПЦ от

концентрации вирусной РНК и постоянное значение эффективности реакций ОТ и ПЦР-РВ в изучаемом диапазоне титров вирусов. На основе линейного уравнения графиков эффективность ОТ-ПЦР-РВ для вируса краснухи составила 1,97. Калибровочные графики были воспроизводимы, сохраняя при повторных измерениях схожие значения  $R^2$  и тангенсы углов наклона [22].

Апробацию метода количественной оценки вируса краснухи проводили на контрольных образцах вакцинных препаратов на основе штамма Wistar RA 27/3 (Таблица 22), проанализировав их в четырех повторах методом ОТ-ПЦР-РВ и в трех повторах титрованием по конечной точке ЦПД. Согласно рекомендации ВОЗ метод определения специфической активности вируса краснухи может применяться при условии, что погрешность измерения титра вируса не превышает  $0,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$  [WHO/VSQ/97.04]. Разница между величиной титра вируса краснухи в контрольных препаратах, определенная методом ОТ-ПЦР-РВ и референсным методом титрования по ЦПД, не превышала  $0,2 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ , что укладывается в допустимые ВОЗ пределы [22].



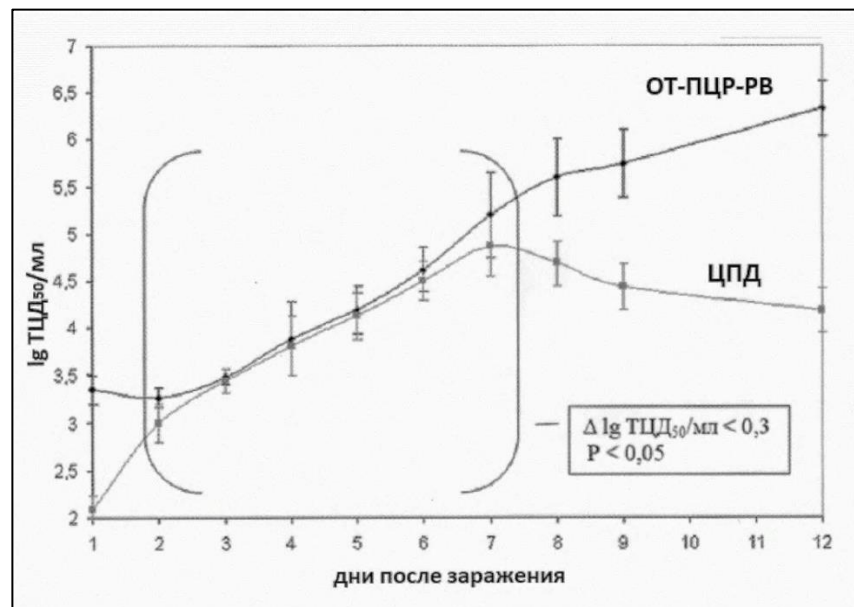
В верхнем правом углу рисунка приведено уравнение графика и коэффициент детерминации  $R^2$ .

Рисунок 21 - График зависимости значений ПЦ от титра вируса краснухи

Таблица 22 - Сравнение титров вируса краснухи в контрольных препаратах

Эталонные препараты	Титрование по ЦПД, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$	Определение вируса методом ОТ-ПЦР-РВ, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$
	Среднее значение $\pm$ SD	
Международный стандарт вируса краснухи, $3,9 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$	$4,0 \pm 0,2$	$4,05 \pm 0,04$
Вакцина против краснухи (Serum Institute of India), $4,5-4,8 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$	$4,75 \pm 0,09$	$4,81 \pm 0,06$

Далее оценивали динамику накопления вируса краснухи в культуре клеток Vero. С этой целью клетки Vero заражали вирусом краснухи (штамм Wistar RA 27/3) при MOI 0,1 ТЦД<sub>50</sub> на клетку и отбирали образцы культуральной жидкости каждые 24 часа, в которых оценивали накопление вируса методами ОТ-ПЦР-РВ и титрования по ЦПД. На основании полученных результатов были построены кривые роста вирусов краснухи в культуре клеток Vero (Рисунок 22). Со 2-го по 7-й день после инфицирования (п.и.) клеток Vero значения титров вируса, определенные методами ОТ-ПЦР-РВ и титрования по ЦПД, были близки, при этом разница в величинах не превышала 0,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, а коэффициент корреляции Пирсона был близок к 1 ( $r^2=0,98$ ), что свидетельствует о хорошем совпадении результатов. На сроках культивирования до 2-ого дня и после 7-го дня п.и. отмечена достоверная разница в значениях титра, определенных разными методами, которая имела тенденцию к увеличению в периоде от 7-го до 12-го дня. Расхождение значений титров вируса, определенных разными методами после 7-го дня культивирования, связаны со снижением инфекционного титра и повышением концентрации вирусной РНК в исследуемом материале, что объясняется постепенным разрушением зараженных клеток, сопровождающимся выходом в культуральную жидкость репликативных форм вирусного генома или РНП не полностью собранных вирионов, а также накоплением дефектных интерферирующих геномов. Расхождение в титрах вируса 2-3-го дней культивирования можно объяснить определением в ОТ-ПЦР-РВ РНК вирионов, не связавшихся с клетками при заражении [22].



Каждая точка показывает среднее 3-х (титрование) или 6-ти (ОТ-ПЦР-РВ) значений, полученных в 3-х независимых экспериментах. Отрезки погрешности показывают значения SD.

Рисунок 22 - Кривые накопления вируса краснухи (штамм Wistar RA 27/3) в культуре клеток Vero, построенные по результатам количественной ОТ-ПЦР-РВ и титрования по ЦПД (MOI 0,1 ТЦД<sub>50</sub> на клетку)

Значения титров вируса краснухи, определенные методом ПЦР-РВ, были выше значений, полученных титрованием по ЦПД, что согласуется с более ранними результатами количественных исследований для вируса желтой лихорадки [527], вируса гриппа [528] и вируса лихорадки долины Рифт [529], полученными также в ПЦР-РВ и классическими методами [22].

Важно отметить, что количественное определение вируса, основанное на определении вирусной РНК, учитывает РНК как инфекционных, так и неинфекционных вирионов. В связи с этим, значения вирусного титра, полученные методом ОТ-ПЦР-РВ хорошо коррелируют с данными титрования по ЦПД только при соблюдении определенных условий:

– в вирусном препарате преобладают полноценные (инфекционные) вирионы, а доля дефектных неинфекционных вирионов и свободного РНП мала, что достигается заражением культуры клеток малыми дозами вируса (МОИ 0,1 или ниже);

– сбор вирусного материала для анализа в периоде со 2-го по 7-й день п.и.,

– калибровочные образцы, на основе которых производится расчет значений ТЦД<sub>50</sub>/мл, должны быть получены в тех же условиях, что и исследуемый вирусный материал.

Важными факторами получения более точного результата также является: удаление клеточного дебриса низкоскоростным центрифугированием; хранение вирусного материала в условиях, минимизирующих потерю их инфекционности; введение при необходимости поправочного коэффициента при расчете титра вируса; использование наборов реагентов для выделения вирусной РНК, рекомендованных для количественных тестов. Важно отметить, что метод ОТ-ПЦР-РВ не может полностью заменить традиционные методы контроля специфической активности вируса. Однако в случае необходимости быстрого получения результатов в «режиме реального времени», метод ОТ-ПЦР-РВ представляет ценность. Так, в процессе производства вакцины против краснухи метод может быть использован для определения времени сбора вирусного материала [22].

*Материалы раздела 3.1.2 опубликованы [499; 530].*

### **3.1.3 Конструирование тест-системы для G/P-генотипирования ротавирусов группы А человека методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ**

Ротавирусы группы А являются основной причиной госпитализации детей в возрасте до 5 лет с острым гастроэнтеритом (ОГЭ) в странах с низким охватом вакцинацией против ротавируса. В 2016 г. в мире зарегистрировано 258 миллионов эпизодов ротавирусной диареи и 128 500 случаев смерти среди детей в возрасте до 5 лет [531]. К 2023 году вакцинация против ротавирусного энтерита была включена в национальные программы иммунизации 120 стран мира [532]. В РФ вакцинация против ротавирусной инфекции не включена в НКИ, однако в ряде регионов страны реализуются региональные программы иммунизации детей [533]. Четыре ротавирусные вакцины в настоящее время рекомендованы ВОЗ и лицензированы:

пятивалентные - RotaTeq («Merck», США), ROTASIIL (Институт сыворотки Индии, Индия); моновалентные - Rotarix® («GlaxoSmithKline», Великобритания), ROTAVAC («Bharat Biotech», Индия). Массовая вакцинация против РВА снижает заболеваемость и частоту госпитализации с острым гастроэнтеритом во всех возрастных группах, особенно у младенцев и лиц старше 65 лет [534].

РВА относятся к виду *Rotavirus alphagastroenteritidis* (род *Rotavirus*, семейство *Sedoreoviridae*). Геном ротавирусов представлен 11 сегментами двуцепочечной РНК, кодирующими синтез 12 белков [141]. Современная система субвидовой классификации ротавирусов предполагает генотипирование по всем 11 генам (Iх-Р[x]-Iх-Rх-Сх-Мх-Ах-Nх-Тх-Ех-Нх). Большинство циркулирующих геновариантов РВА человека относятся к трем эволюционным линиям, отличающимся констелляциями генома: Wa-подобные (G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1), DS-1-подобные (G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) и AU-1-подобные (G3-P[3]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3) [141]. Стандартным рутинным подходом к классификации геновариантов РВА является их G/P-генотипирование, согласно которому определяются только варианты генов белков VP7 (ген G) и VP4 (ген P). В соответствии с рекомендациями ВОЗ G/P-генотипирование РВА выполняется в реакции мультиплексной ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией [134] или секвенированием соответствующих генов.

Учитывая известные преимущества ОТ-ПЦР-РВ, нам представилось целесообразным сконструировать систему генотипирования ротавирусов на основе этого метода. За систему классификации генотипов РВА были приняты рекомендации ВОЗ [134] и группы RCWG [141]. При подборе типоспецифичных праймеров и зондов для ОТ-ПЦР-РВ их направляли на участки генов G и P, используемые в качестве мишеней для праймеров при G/P-генотипировании методом мультиплексной ПЦР, согласно рекомендациям ВОЗ [134]. Последовательности подобранных типоспецифичных олигонуклеотидов представлены в (Таблица 14). Для дифференциального выявления 10 вариантов генов, кодирующих белки VP7 (G1, G2, G3, G4, G9), VP4 (P[4], P[6], P[8]) и VP6 (I1, I2), сформировано пять реакционных смесей, в каждой из которых выявляется по два варианта генов (Таблица 23).

Таблица 23 - Реакционные смеси для дифференциального выявления 10 вариантов генов ротавирусов методом мультиплексной ПЦР-РВ

Флуорофор зонда	Номер реакционной смеси и выявляемые варианты генов (размер ампликона, п.н.)				
	1	2	3	4	5
ROX	G1 (127)	G2 (208)	G3 (188)	G4 (133)	G9 (197)
R6G	P[4] (152)	P[6] (99)	P[8] (235)	I1 (116)	I2 (197)

Оптимизация условий генотипирования РВА методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ была достигнута подбором температурно-временного режима этапов ОТ и ПЦР-РВ, комбинаций

праймеров и зондов в реакционных смесях, минимизирующих вероятность неспецифического отжига и образования димеров праймеров.

Первичная апробация разработанной тест-системы проведена с использованием фекальных образцов от детей с подтвержденным ротавирусным энтеритом и двух референсных методов генотипирования ротавирусов, рекомендованных ВОЗ [134] - мультиплексная ПЦР с детекцией в агарозном геле и секвенирование фрагментов генов G и P. Для секвенирования были отобраны образцы с высокой концентрацией ротавирусной РНК по данным видоспецифической ОТ-ПЦР-РВ. Было произведено определение первичной нуклеотидной последовательности фрагментов генов белков VP7 (880 п.н.) и VP4 (660 п.н.), амплифицированных в реакции ОТ-ПЦР. Результаты генотипирования клинических изолятов ротавирусов тремя методами были сопоставимы (Таблица 24).

Таблица 24 - Результаты генотипирования, полученные тремя методами

№ пп	Номер клинического образца в лабораторной коллекции	Результат генотипирования		
		Мультиплексная ПЦР (ВОЗ)	Секвенирование	ОТ-ПЦР-РВ
1.	188	G1, G4, P[8]	н.а.	G1, G4, P[8]
2.	208	G1P[8]	G1P[8]	G1P[8]
3.	3_703	G9P[8]	G9P[8]	G9P[8]
4.	13_751	G2P[4]	G2P[4]	G2P[4]
5.	14_756	G4P[8]	G4P[8]	G4P[8]
6.	16_760	G2,4P[8,4]	н.а.	G2,4P[8,4]
7.	17_763	G2P[4]	G2P[4]	G2P[4]
8.	22_776	G4P[8]	G4P[8]	G4P[8]
9.	33_801	G4P[8]	G4P[8]	G4P[8]
10.	35_803	G2P[4]	G2P[4]	G2P[4]
11.	36_804	G3P[8]	G3P[8]	G3P[8]
12.	3_2013	G4P[8]	G4P[н.а.]	G4P[8]
13.	4_2013	G9P[8]	G9P[н.а.]	G9P[8]
14.	9_2013	G3P[8]	G3P[н.а.]	G3P[8]
15.	15_2013	G9P[8]	G9P[н.а.]	G9P[8]
16.	19_2013	G9P[8]	G9P[н.а.]	G9P[8]
17.	20_2013	G9P[8]	G9P[н.а.]	G9P[8]
18.	22_2013	G9P[8]	G9P[н.а.]	G9P[8]
19.	24_2013	G9P[8]	G9P[н.а.]	G9P[8]
20.	27_2013	G4P[8]	G4P[н.а.]	G4P[8]
21.	32_2013	G9P[8]	G9P[н.а.]	G9P[8]
22.	34_2013	G9P[8]	G9P[н.а.]	G9P[8]
23.	35_2013	G9P[8]	G9P[н.а.]	G9P[8]
24.	36_2013	G9P[8]	G9P[н.а.]	G9P[8]
25.	37_2013	G2P[4]	G2P[н.а.]	G2P[4]

н.а. – не анализировали



Всего в процессе валидации метода были определены 44 нуклеотидные последовательности генов G и P 35 изолятов ротавирусов и депонированы в базу данных GenBank, NCBI (GenBank ID с KT000090.1 по KT000133.1).

*Материалы раздела 3.1.3 опубликованы [535; 536].*

### **3.1.4 Разработка нового подхода к генетической характеристике ротавирусов методом нанопорового секвенирования**

Существующие подходы к генетической характеристике РВА заключаются в G/P-генотипировании методом мультиплексной типоспецифической ПЦР и полном или частичном секвенировании по Сэнгеру сегментов 9 (ген G) и 4 (ген P) генных ротавирусов [134]. При этом, в исследованиях, посвященных изучению генетического разнообразия ротавирусов, отмечается большая доля нетипируемых традиционными методами штаммов [537; 538]. Разработка технологии НПС открыла новые перспективы совершенствования методов эпидемиологического мониторинга ротавирусной инфекции. Преимуществами нанопорового секвенатора является портативность, высокая производительность, быстрая пробоподготовка, уникальная возможность получения длинных прочтений, возможность мультиплексного анализа, отсутствие необходимости капитальных вложений в оборудование. Для быстрой подготовки генетического материала для НПС подходит высокоочищенная двуцепочечная ДНК. Следовательно, для секвенирования геномов бактерий, грибов, ДНК-содержащих вирусов можно напрямую использовать ДНК, выделенную из биологических образцов. Однако, подготовка для НПС генома РНК-содержащих вирусов, в особенности ротавирусов, имеющих сегментированный РНК-геном, требует разработки специфических подходов. Целью настоящего исследования являлась разработка подходов к генетической характеристике РВА методом НПС.

#### ***Специфическая амплификация генных сегментов РВА***

ДНК-копии ротавирусного генома получали в реакции двухэтапной ОТ и ПЦР согласно схеме (Рисунок 23). Для получения полноразмерной кДНК генных сегментов РВА были сконструированы шесть праймеров (unRAf1, unRAf2, unRAf3, unRAR1, unRAR2, unRAR3) для ОТ (Таблица 11), комплементарные консервативным областям длиной 10 п.н. на 5'- и 9 п.н. на 3'-концах генных сегментов РВА, которые необходимы для экспрессии генов и репликации вирусного генома. Праймеры были разработаны на основе выравнивания последовательностей генных сегментов геновариантов РВА человека с различными генотипами, рекомендованными в качестве референсных рабочей группой RCWG [141]. Все праймеры для ОТ были удлинены на 5'-конце с помощью 20-нуклеотидной последовательности для связывания с универсальным праймером Up, разработанным Froussard P. с соавт. и используемым при амплификации

сегментов ротавирусного генома одновременно в качестве прямого и обратного праймеров (Таблица 11) [500].

Разработанные праймеры были апробированы на РНК ротавируса, выделенной из четырех фекальных образцов от детей с лабораторно подтвержденным ротавирусным энтеритом (образец 1, содержащий РВА генотипа G1P[8], 2 - GxP[8], 3 - G1P[8], 4 - G3P[8]) (Рисунок 24). На основе выделенной из образцов вирусной РНК в реакции ОТ с РВА-специфическими праймерами (unRAf1, unRAf2, unRAf3, unRAR1, unRAR2, unRAR3) получали кДНК, которую далее амплифицировали в реакции ПЦР с универсальным праймером Up. Электрофоретический анализ выявил в продуктах ПЦР присутствие нескольких фракций ДНК с преобладанием фрагментов длиной от 600 до 3000 п.н., что приблизительно соответствует распределению длин сегментов генома РВА (Рисунок 24) [152].

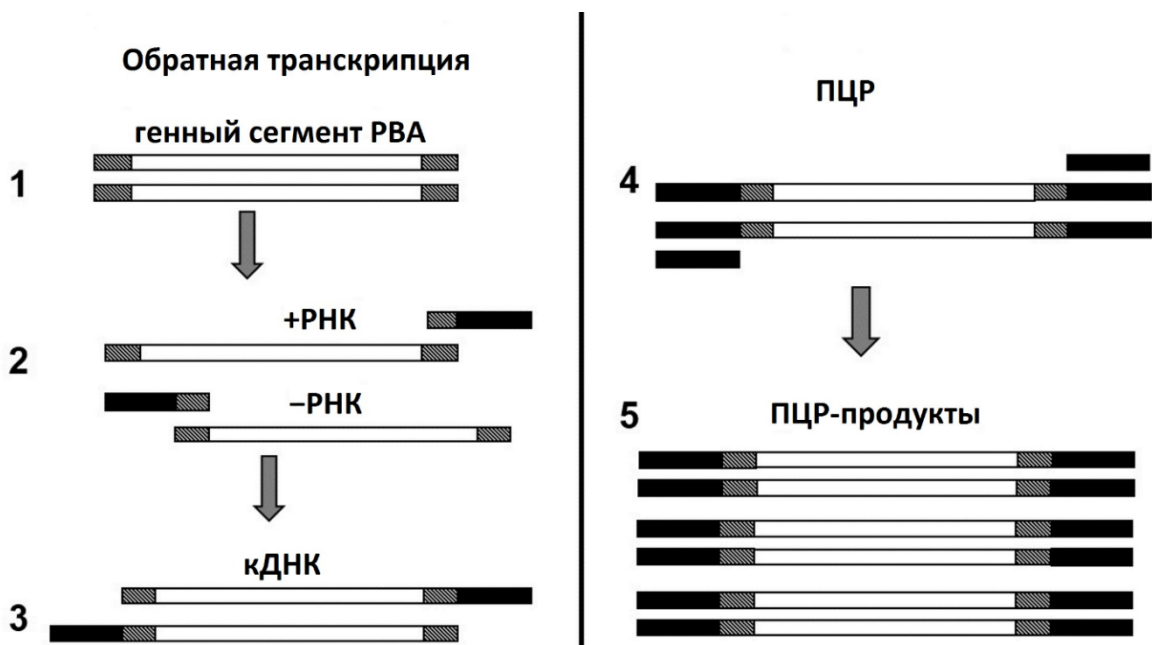
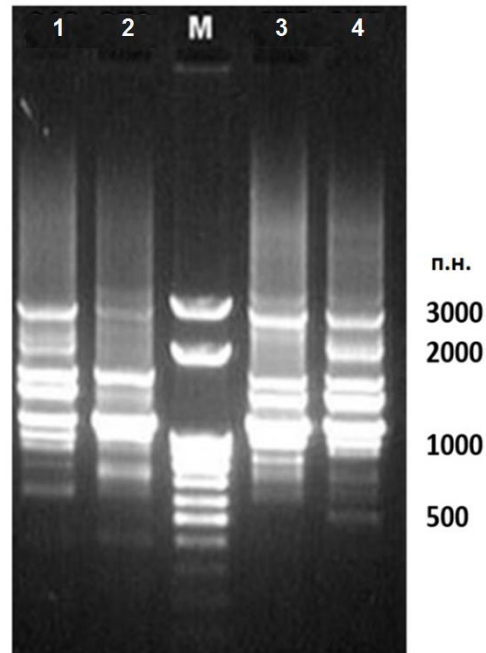


Рисунок 23 - Схема специфической амплификации сегментов ротавирусного генома

Эффективность амплификации сегментов генома РВА оценивали по приросту концентрации ротавирусспецифичной ДНК в результате ПЦР-амплификации. Для этого исследовали РНК, выделенную из 14 фекальных образцов от детей с ротавирусным энтеритом, содержащих РВА разных генотипов, включая G4P[8], G2P[4], G1P[8], G6P[x]. С пулом праймеров unRAf1, unRAf2, unRAf3, unRAR1, unRAR2, unRAR3 в реакции ОТ получали кДНК, которую далее амплифицировали в реакции ПЦР с универсальным праймером Up. Далее методом количественной ПЦР-РВ определяли концентрацию вирусной ДНК в препаратах кДНК и ампликонов, что позволило рассчитать фактор амплификации, представляющий собой

отношение концентрации вирусоспецифической ДНК в ПЦР-продукте (после ПЦР-амплификации) и кДНК (после реакции ОТ). В среднем фактор амплификации для генных сегментов 1 ( $\approx 3300$  п.н.), 6 ( $\approx 1350$  п.н.) и 7 ( $\approx 1100$  п.н.) варьировал от  $4,2 \cdot 10^4$  до  $2,7 \cdot 10^6$  и находился в обратной зависимости от размера генного сегмента, однако различия не были достоверными (Рисунок 25).



Электрофорез ампликонов в агарозном геле с бромистым этидием. Дорожки: 1, 2, 3, 4 – продукты амплификации образцов ротавирусной кДНК. М – маркер молекулярного веса ДНК (справа от рисунка указаны размеры фрагментов ДНК маркера, п.н.).

Рисунок 24 - Продукты специфической амплификации вирусной кДНК, полученные в реакции ОТ-ПЦР

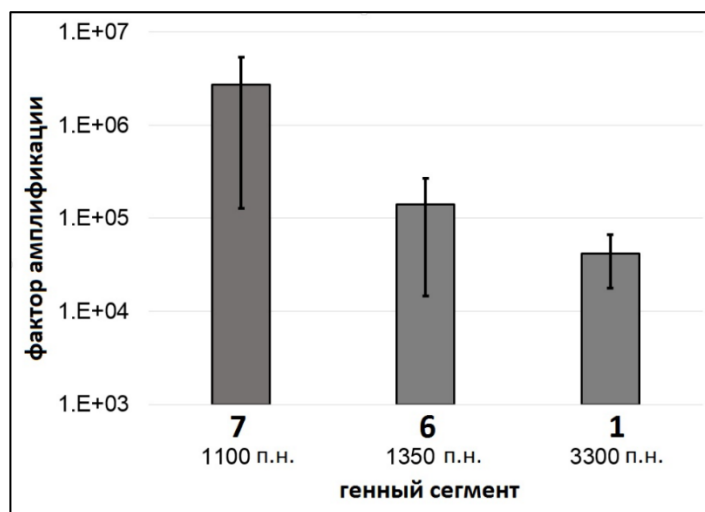


Рисунок 25 - Эффективность амплификации сегментов ротавирусного генома 1, 6 и 7

### *Нанопоровое секвенирование генома РВА*

Для генотипирования методом НПС были выбраны лабораторные штаммы РВА Wa (генотип - G1P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1), DS-1 (G2P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) и 568 – (G3P[3]), имеющие разные констелляции генных сегментов и относящиеся к трем разным эволюционным линиям РВА (Wa-, DS-1- и AU-1-подобные). Полногеномные последовательности штаммов Wa, DS-1 имеются в GenBank, что позволяет оценить точность НПС. Для штамма 568 мы ранее определили G/P-генотип и частичную нуклеотидную последовательность сегмента 9 (координаты - 122-868 нт), которая на 100% была идентична штамму РВА макак-резусов RRV (GenBank ID HQ665466.1), что свидетельствует о тесном филогенетическом родстве между этими штаммами и позволяет использовать последовательности его генома в качестве референсных. Исследуемые штаммы РВА выращивали в культуре клеток MA-104, выделяли из зараженных клеток суммарную РНК, получали кДНК с помощью праймеров unRAf1, unRAf2, unRAf3, unRAR1, unRAR2, unRAR3 и амплифицировали в реакции ПЦР с праймером Up. Полученные ампликоны очищали, оценивали их концентрацию, готовили библиотеки ДНК для НПС с помощью набора Rapid Sequencing Kit и секвенировали на приборе на MinION (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания).

НПС геномов штаммов Wa, DS-1 и 568 дало в общей сложности 97443, 100889 и 111429 прочтений в трех независимых постановках, соответственно (Таблицы 25, 26 и 27). Доля прочтений, классифицированных как фрагменты генома РВА от общего количества прочтений, превышала 85%, что указывает на высокую специфичность амплификации. Средняя идентичность последовательностей отдельных прочтений относительно референсных последовательностей варьировала от 88% до 91% для штаммов Wa и DS-1, что соответствует заявленной производителем точности секвенирования MinION.

Были получены прочтения для каждого из 11 генных сегментов штамма Wa, при этом количество прочтений варьировало в широких пределах для разных сегментов - от 81 до 54651 (Таблица 25). Достигнуто 100%-е покрытие 10 генных сегментов, покрытие сегмента 1 составило 97,9%, тогда как покрытие для всего генома составило 99,6%. Была установлена констелляция генов исследованного штамма, которая полностью соответствовала генотипу штамма Wa: G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1. Идентичность консенсусных последовательностей референсным (точность секвенирования) варьировала от 99,7% до 100%. Полученные консенсусные последовательности генных сегментов штамма Wa депонированы в базе данных GenBank (GenBank ID с MT796878 по MT796888).

Таблица 25 - Результаты НПС генома штамма Wa PVA (культуральный вирус)

№ сегм.	Вирусный белок	Генотип	Количество прочтений	Медиана длины выравнивания, нт	Медиана идентичности прочтения с референсом*, %	Полнота покрытия сегмента, %	Идентичность консенсуса с референсом, %
1.	VP1	R1	1592	634	91,3	97,9	99,9
2.	VP2	C1	54651	533	91,6	100	99,9
3.	VP3	M1	8003	485	91,3	100	100
4.	VP4	P[8]	5898	467	91,5	100	99,9
5.	NSP1	A1	926	606	91,6	100	99,9
6.	VP6	I1	2697	428	91,2	100	99,7
7.	NSP3	T1	11099	582	91,0	100	99,9
8.	NSP2	N1	3188	490	91,1	100	100
9.	VP7	G1	8276	573	90,7	100	99,8
10.	NSP4	E1	81	354	90,2	100	99,6
11.	NSP5/6	H1	1032	456	91,1	100	99,7

\* В качестве референсных использованы последовательности генных сегментов штамма Wa, GenBank ID с JX406747.1 по JX406757.1.

Для штамма DS-1 прочтения были получены для восьми генных сегментов, при этом количество прочтений варьировало для разных сегментов от 18 до 58753 (Таблица 26). 100%-е покрытие было достигнуто для сегментов 1, 4, 6, 7, 9, 10, 11, покрытие сегмента 2 составляло 13%, тогда как покрытие для всего генома составило 59,0%. Идентичность консенсусных последовательностей референсным варьировала от 99,6% до 100%. Конstellляция генов соответствовала штамму DS-1: G2-P[4]-I2-R2-Cx-Mx-Ax-Nx-T2-E2-H2. Полученные консенсусные последовательности генных сегментов штамма DS-1 депонированы в базе данных GenBank (GenBank ID с MT796870 по MT796877).

Таблица 26 - Результаты НПС генома штамма DS-1 PVA (культуральный вирус)

№ сегм.	Вирусный белок	Генотип	Количество прочтений	Медиана длины выравнивания, нт	Медиана идентичности прочтения с референсом*, %	Полнота покрытия сегмента, %	Идентичность консенсуса с референсом, %
1.	VP1	R2	910	400	91,9	100	99,9
2.	VP2	Cx	18	324	88,0	13	100
3.	VP3	Mx	0	-	-	0	-
4.	VP4	P[4]	58753	853	91,0	100	99,6
5.	NSP1	Ax	0	-	-	0	-
6.	VP6	I2	12464	659	91,3	100	100
7.	NSP3	T2	7259	436	90,8	100	99,9
8.	NSP2	Nx	0	-	-	0	-
9.	VP7	G2	16655	588	90,9	100	100
10.	NSP4	E2	174	377	91,3	100	99,8
11.	NSP5/6	H2	4656	523	91,1	100	99,7

\* В качестве референсных использованы последовательности генных сегментов штамма DS-1, GenBank ID с HQ650116.1 по HQ650126.1.

Для штамма 568 прочтения были получены для десяти генных сегментов (за исключением сегмента 7); количество прочтений варьировало для разных сегментов от 35 до 24388 (Таблица 27). Достигнуто 100% покрытие генных сегментов, за исключением сегмента 5 (87,4%), тогда как покрытие для всего генома составило 92,9%. BLAST-анализ консенсусных последовательностей выявил высокий уровень идентичности (>99%) геному штамма RRV (GenBank ID с EU636924.1 по EU636934.1), поэтому для выравнивания и создания консенсусной последовательности в качестве референсной использовали геном штамма RRV. Генотип штамма 568 по 10 генам был определен как G3-P[3]-I2-R2-C3-M3-A9-N2-Tx-E3-H6 (соответствует генотипу штамма RRV). Полученные консенсусные последовательности генных сегментов штамма 568 депонированы в базе данных GenBank (GenBank ID с MT796860 по MT796869).

Поскольку НПС штамма DS-1 обеспечило низкое покрытие генома (59% от общего размера генома), эффективность НПС была изучена при секвенировании двух других DS-1-подобных РВА. Так, методом НПС был секвенирован геном РВА RVA/Hu/RUS/Moscow-714/2014 (GenBank ID KT000095.1, генотип G2P[4]) из образца фекалий ребенка с ротавирусным энтеритом. Получено 172934 прочтений для 11 генных сегментов, количество прочтений варьировало от 187 до 66325 (Таблица 28). Для сегментов 3 и 4 были получены неполные последовательности с покрытием 86% и 72%, соответственно. Было достигнуто покрытие генома в 94,5%, что позволило отнести штамм к генотипу G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2. Полученные консенсусные последовательности генных сегментов ротавируса RVA/Hu/RUS/Moscow-714/2014 депонированы в базе данных GenBank (GenBank ID с MT767398 по MT767408).

Таблица 27 - Результаты НПС генома штамма 568 РВА (культуральный вирус)

№ сегм.	Вирусный белок	Генотип	Количество прочтений	Медиана длины выравнивания, нт	Медиана идентичности прочтения с референсом*, %	Полнота покрытия сегмента, %	Идентичность консенсуса с референсом, %
1.	VP1	R2	18538	440	89,8	100	99,1
2.	VP2	C3	8306	482	90,0	100	99,1
3.	VP3	M3	19083	417	91,0	100	99,8
4.	VP4	P[3]	35	877	77,4	100	99,7
5.	NSP1	A9	1825	436	90,4	87,4	99,9
6.	VP6	I2	24388	630	90,0	100	99,6
7.	NSP3	Tx	0	-	-	-	-
8.	NSP2	N2	6084	374	90,4	100	100
9.	VP7	G3	17818	590	90,3	100	100
10.	NSP4	E3	1777	469	90,3	100	100
11.	NSP5/6	H6	12754	496	86,4	100	99,6

\* В качестве референсных использованы последовательности генных сегментов штамма RRV, GenBank ID с EU636924.1 по EU636934.1.

Таблица 28 - Результаты НПС генома DS-1-подобного штамма RVA/Hu/RUS/Moscow-714/2014 (G2P[4]) (клинический образец)

№ сегм.	Вирусный белок	Генотип	Количество прочтений	Медиана длины выравнивания, нт	Медиана идентичности прочтения с референсом*, %	Полнота покрытия сегмента, %	Идентичность консенсуса с референсом, %
1.	VP1	R2	13247	644	83,0	100	91,2
2.	VP2	C2	13258	895	85,6	100	94,2
3.	VP3	M2	362	883	82,7	86	89,0
4.	VP4	P[4]	7525	695	85,4	72	93,6
5.	NSP1	A2	66325	745	84,9	100	93,5
6.	VP6	I2	1521	711	80,8	100	88,1
7.	NSP3	T2	36542	693	86,4	100	94,8
8.	NSP2	N2	229	630	81,0	100	87,3
9.	VP7	G2	31544	650	85,4	100	93,8
10.	NSP4	E2	187	472	83,9	100	91,7
11.	NSP5/6	H2	2556	592	85,2	100	92,9

\* В качестве референсных использованы последовательности генных сегментов штамма DS-1, GenBank ID с HQ650116.1 по HQ650126.1.

Также было проведено НПС реассортантного DS-1-подобного ротавируса из клинического образца RVA/Hu/RUS/Moscow-40/2020/G3 (G3P[8]I2). В результате были определены последовательности 10 генных сегментов с покрытием генома 86% (GenBank ID с MW558493.1 по MW558502.1) и классифицированы (Таблица 29).

Таблица 29 - Результаты НПС генома DS-1-подобного ротавируса RVA/Hu/RUS/Moscow-40/2020/G3 (G3P[8]I2) (клинический образец)

№ сегм.	Вирусный белок	Генотип	Количество прочтений	Медиана длины выравнивания, нт	Медиана идентичности прочтения с референсом*, %	Полнота покрытия сегмента, %	Идентичность консенсуса с референсом, %
1.	VP1	R2	12792	535	100	89,4	99,2
2.	VP2	C2	11193	559	100	89,5	99,5
3.	VP3	Mx	-	-	-	-	-
4.	VP4	P[8]	2785	520	100	89,6	99,5
5.	NSP1	A2	53841	517	100	89,6	99,2
6.	VP6	I2	16479	501	100	89,4	99,7
7.	NSP3	T2	80554	525	100	89,5	99,2
8.	NSP2	N2	40022	472	100	88,5	99,8
9.	VP7	G3	25059	519	100	89,6	99,8
10.	NSP4	E2	10222	486	100	82,6	91,0
11.	NSP5	H2	11351	411	100	89,3	99,7

\* В качестве референсных использованы последовательности генных сегментов штамма RVA/Human-wt/THA/SKT-281/2013/G3P[8], GenBank ID с LC086714.1 по LC086724.1.

Подход также был апробирован на ранее изученном редком изоляте РВА человека RVA/Hu/RUS/Moscow-1P/2015 (генотип G4P[6], GenBank ID MG271938.1) из клинического образца ребенка с ротавирусным энтеритом (Таблица 30).

Таблица 30 - Результаты НПС генома ротавируса RVA/Hu/RUS/Moscow-1P/2015 (G4P[6]) (клинический образец)

№ сегм.	Вирусный белок	Генотип	Количество прочтений	Медиана длины выравнивания, нт	Медиана идентичности прочтения с референсом*, %	Полнота покрытия сегмента, %	Идентичность консенсуса с референсом, %
1.	VP1	R1	1372	846	100	81,2	96,3
2.	VP2	C1	3795	610	100	80,9	87,6
3.	VP3	M1	1995	538	100	80,9	95,9
4.	VP4	P[6]	633	634	20	82,5	95
5.	NSP1	A1	546	564	100	80,3	77,5
6.	VP6	I1	15187	609	100	84,0	98,5
7.	NSP3	T1	14566	641	100	80,9	98,3
8.	NSP2	N1	175	503	36	80,6	88,2
9.	VP7	G4	1465	561	100	79,4	96,1
10.	NSP4	Ex	-	-	-	-	-
11.	NSP5/6	H1	77	480	100	85,5	97,1

\* В качестве референсных использованы последовательности генных сегментов штамма RVA/Human-wt/CHN/R1954/2013/G4P[6], GenBank ID с KF726066.1 по KF726076.1.

Было достигнуто покрытие генома в 81,7% (10 генных сегментов), что позволило отнести этот ротавирус к генотипу G4-P6-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-Ex-H1. Полученные консенсусные последовательности генных сегментов штамма RVA/Hu/RUS/Moscow-1P/2015 депонированы в базе данных GenBank (GenBank ID с MT876633 по MT876642). BLAST-анализ геномных последовательностей штамма RVA/Hu/RUS/Moscow-1P/2015 показал их высокую гомологию как с РВА, выделенными от человека (например: KM247280.1, KP222851.1), так и от свиней (например: JX498956.1, MK227392.1), обнаруженными в Китае, Мозамбике и Бангладеш (идентичность от 98,1% до 98,6%).

Разнообразие вирусных геномов требует использования инновационных подходов при подготовке вирусного материала для НПС. Геномы вирусов с двуцепочечным ДНК-геномом, таких как герпесвирусы, поксвирусы или аденовирусы, легко поддаются НПС [539–541]. Однако секвенирование вирусных РНК-геномов остается сложной задачей из-за необходимости обратной транскрипции РНК-генома в ДНК и высокой генетической пластичности этих вирусов из-за высокой скорости появления мутаций. Мы разработали набор из шести праймеров для обратной транскрипции и одного универсального праймера для ПЦР для вирусоспецифической амплификации ротавирусного генома с получением библиотеки двуцепочечной ДНК, пригодной для дальнейшего НПС. Ранее, в работах по генетической характеристике вирусов



гриппа, праймеры, направленные на концевые консервативные участки генных сегментов, использовались для амплификации сегментированного вирусного РНК-генома [542–544]. В настоящем исследовании по аналогии были разработаны праймеры, позволяющие получать в реакции ОТ-ПЦР ампликоны, соответствующие генным сегментам РВА. Наш подход к пробоподготовке позволил амплифицировать геном РВА в одной реакции с использованием одного набора праймеров, тогда как секвенирование по Сэнгеру требует амплификации каждого сегмента с помощью вирус-специфичных праймеров. Эффективность амплификации разных генных сегментов РВА варьировала в широких пределах, вероятно, из-за гетерогенности последовательностей концевых участков генома РВА, влияющих на связывание праймеров с вирусной РНК на стадии ОТ. Кроме того, на эффективность амплификации влияла способность Taq ДНК-полимеразы более эффективно амплифицировать короткие фрагменты ДНК, чем длинные.

НПС геномов штаммов Wa и DS-1 позволило определить их геномные последовательности с точностью, превышающей 99,5%. Таким образом, точность секвенирования генома РВА, достигнутая на приборе MinION, дает возможность не только определить генотип РВА, но и установить штаммовую принадлежность вируса. Для большинства генных сегментов была достигнута средняя «глубина» прочтения более 50. В некоторых случаях последовательности были «собраны» с более низкой глубиной, исходя из того, что для генотипирования вируса 100%-я точность секвенирования не требуется. Следует отметить, что для всех изученных штаммов РВА были определены последовательности таких диагностически значимых сегментов генов, как 9-й (VP7), 4-й (VP4) и 6-й (VP6), определяющие G/P-генотип и серогруппу.

Если для штамма Wa было достигнуто 97,9%-е покрытие генома, то для штамма DS-1 оно составляло только 59%. Однако важно отметить, что покрытие генома в 94,5% и 86% было достигнуто для двух других DS-1-подобных штаммов, выделенных из клинических образцов. Причины столь значительной разницы в покрытии геномов филогенетически родственных штаммов РВА неизвестны. Вероятно, низкая эффективность амплификации генома штамма DS-1 связана со значительно более низкой концентрацией РНК по сравнению с DS-1-подобными штаммами из клинических образцов. Кроме того, это может указывать на некоторые непреднамеренные различия в условиях пробоподготовки и на необходимость их дальнейшей оптимизации для достижения более стабильных результатов.

В настоящем исследовании был также использован штамм РВА 568, филогенетически близкий к штамму RRV макак-резусов, представляющий, вероятно, реассортант РВА различных видов животных. Согласно Matthijnsens J. с соавт. большинство генов RRV имеют последовательности, типичные для РВА собак и кошек. Остальные гены RRV, по-видимому,

возникли в результате реассортации со штаммами РВА коров, человека или других хозяев [545]. Для штамма 568 было достигнуто более чем 99% сходство 10 генных сегментов со штаммом RRV, что позволяет предположить, что штаммы RRV и 568 имеют общее происхождение. В контексте нашего исследования это важно, поскольку геном штамма RRV (G3-P[3]-I2-R2-C3-M3-A9-N2-T3-E3-H6) состоит из вариантов генов различных эволюционных линий РВА, включая гены, характерные для AU-1-подобных ротавирусов (G3, P[3], C3, M3, T3, E3). Кроме того, для ротавируса RVA/Hu/RUS/Moscow-1P/2015, предположительно животного (свиного) происхождения, было достигнуто покрытие генома на 81,7%. BLAST-анализ последовательностей генов VP4, VP6 и VP7 этого геноварианта выявил высокую степень гомологии со штаммами РВА, выделенными от свиней (KX363402, MK227950, KX363435, MK227948, MK227391, MK227402, KX363414, MG066585, KJ128957, JX498957, JX498956, MK227392, MN133419, MN133444) [546; 547] и штаммами РВА, предположительно свиного происхождения, но выделенными от человека (KF726067, KF726067, KF726056) [548]. Для большинства генов ротавирусов 568 и RVA/Hu/RUS/Moscow-1P/2015 получены полноразмерные последовательности, что свидетельствует о применимости разработанного подхода для генетического анализа РВА животного происхождения.

Внедрение методов секвенирования следующего поколения (NGS) в начале 2000-х годов открыло перспективы для совершенствования методов эпидемиологического мониторинга вирусных инфекций [549]. Однако широкое применение методов NGS ограничивалось сложной, трудоемкой и длительной пробоподготовкой, высокой стоимостью и сложностью оборудования, позволяющим получать только короткие прочтения. Прибор MinION (Oxford Nanopore Technologies), который использовался в нашей работе, реализует технологию секвенирования третьего поколения [550], значительно отличающуюся от платформ секвенирования 2 поколения (NGS). MinION имеет небольшой размер (примерно 100 г.) и требует относительно меньших капитальных затрат по сравнению с платформами NGS. Секвенирование на приборе MinION позволяет получать длинные прочтения, размер которых ограничен только размером секвенируемой молекулы ДНК. Еще одним преимуществом НПС является анализ результатов секвенирования в режиме реального времени и быстрая подготовка библиотеки ДНК для секвенирования. При таком значительном отличии технических характеристик от секвенаторов второго поколения, MinION имеет высокую производительность, позволяя определять миллиарды нуклеотидов за один запуск. В работе был использован набор реагентов Rapid Sequencing Kit (Oxford Nanopore Technologies), позволяющий получить готовую для секвенирования библиотеку ДНК в течение 10-15 мин. Упомянутый набор реагентов рекомендован производителем для анализа высокомолекулярной ДНК (>30 тыс. п.н.), в то время как размер проанализированных ампликонов РВА варьировал от 660 до 3300 п.н.

Полученные данные показывают, что использование данного набора также может быть полезным при анализе коротких ампликонов, даже несмотря на то, что условия для приготовления библиотеки кДНК предусматривают их дополнительную фрагментацию ферментом транспозазой. После 6 часов секвенирования ампликонов РВА с помощью MinION была достигнута высокая производительность, превышающая  $3 \cdot 10^7$  п.н. на образец.

Одним из ограничений секвенирования на MinION является высокая стоимость 1 цикла, примерно 1500 долларов США (по ценам 2018 г.), что включает проточную ячейку и реактивы для подготовки библиотеки ДНК. Снизить стоимость секвенирования одного образца можно за счет мультиплексирования анализа с использованием баркодов для анализируемой ДНК. Для полной реализации потенциала технологии НПС остается решить ряд технических проблем, но уже сейчас понятно, что эта технология способна усовершенствовать методологию исследования генетического разнообразия РВА.

Таким образом, благодаря уникальным характеристикам, технология НПС имеет значительный потенциал в качестве инструмента эпидемиологических исследований и мониторинга вирусных инфекций. Разработанный подход позволяет секвенировать на приборе MinION генные сегменты Wa-, DS-1- и AU-1-подобных РВА с точностью > 99%. Несмотря на то, что покрытие генома варьировало для разных штаммов от 59,0 до 99,6% (в среднем 86%), для всех исследованных геновариантов дана генетическая характеристика диагностически значимых генных сегментов - 9, 4 и 6, определяющих G/P-генотип (белки VP7 и VP4) и серогруппу (белок VP6). Очевидно, что для достижения полного покрытия генома РВА требуется дальнейшая оптимизация праймеров и условий подготовки образцов. Однако даже без оптимизации разработанный принцип секвенирования генома РВА может быть полезен для генетической характеристики редких геновариантов РВА и ротавирусов животного происхождения, которые не поддаются типированию традиционными методами.

*Материалы раздела 3.1.4 опубликованы [152].*

## **3.2 ИССЛЕДОВАНИЕ ВИДОВОГО И СУБВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

### **3.2.1 Исследование генетического разнообразия ротавирусов человека на территории московского региона в период с 2009 по 2020 гг.**

В настоящее время среди циркулирующих в мире геновариантов РВА доминируют ротавирусы с генотипами G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G12P[8] и G9P[8], гомотипичных или частично гетеротипичных по отношению к используемым лицензированным вакцинам (RotaTeq и Rotarix) [126]. Описаны случаи как межвидовой передачи РВА от животных человеку, так и заражения человека штаммами, появившимися в результате реассортации ротавирусов

животных и человека [548; 551; 552]. Целью настоящего исследования являлся анализ генетических характеристик ротавирусов группы А, циркулировавших в Москве в 2009-2020 годы, включая редкие геноварианты, нетипируемые методом ПЦР. Высокая изменчивость РВА [553], территориальные различия в распределении циркулирующих геновариантов, увеличение их разнообразия под влиянием естественного и поствакцинального иммунитета, изменение генетической структуры РВА как в странах с плановой вакцинацией, так и без нее, требуют постоянного эпидемиологического мониторинга ротавирусной инфекции [554].

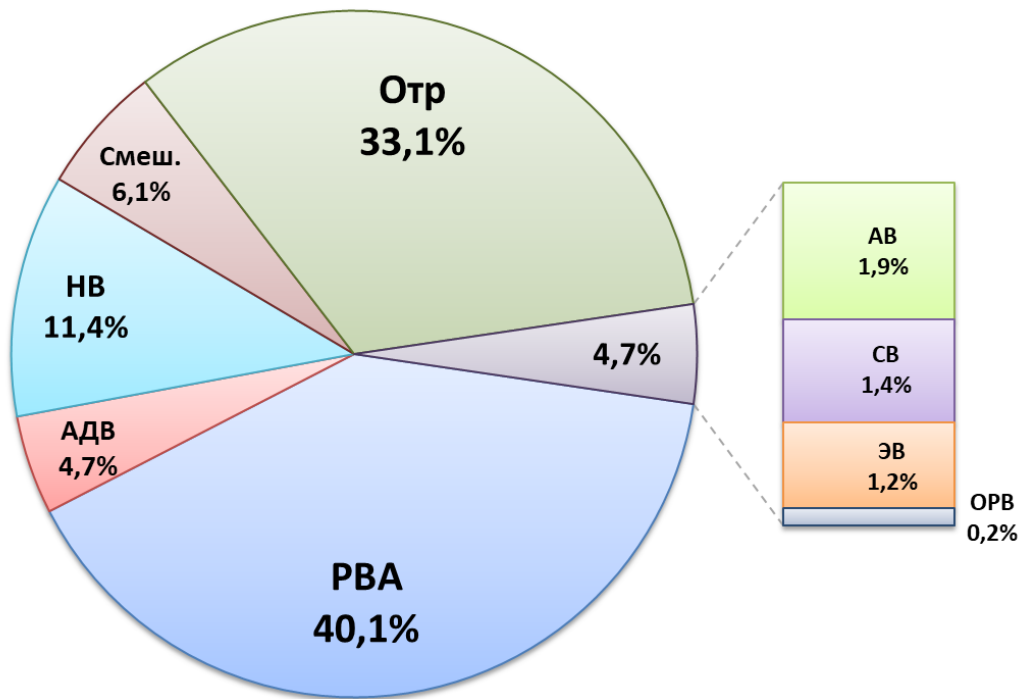
### **3.2.1.1 Ретроспективное исследование этиологии острых вирусных кишечных инфекций в московском регионе в период с 2009 по 2014 гг.**

Настоящее исследование проведено с использованием лабораторных тест-систем на основе мультиплексной ПЦР-РВ для дифференциального выявления кишечных вирусов и генотипирования РВА, разработанных на предыдущих этапах. Для исследования было получено 594 фекальных образца (Панель К4), собранных в период с января 2009 по январь 2014 гг. от 429 детей в возрасте до 5 лет (медиана 13,5 месяцев), госпитализированных в стационар в первые 72 часа от начала заболевания с диагнозом ОГЭ. У 165 детей образцы стула были собраны дважды - в день госпитализации (первичные образцы) и перед выпиской из стационара с интервалом в 7 дней (медиана) [6-8 день] (повторные образцы).

В структуре кишечных вирусов, выявленных у детей в день госпитализации (Панель К4, Рисунок 26), ожидаемо доминировали ротавирусы группы А (40,1%). Значительной была также доля норовирусов (11,4%) и аденовирусов (4,7%). Долевое участие остальных вирусов в этиологии ОГЭ была незначительной – от 0,2 до 1,9%. Смешанная инфекция была обнаружена в 6,0% случаев с преобладанием в ее составе ротавирусов группы А. Наиболее часто встречались следующие сочетания вирусов: АДВ/РВА и РВА/НВ (по 7 случаев), РВА/РВС, РВА/НВ/ЭВ/АВ, СВ/АВ, ЭВ/НВ, РВА/ЭВ/НВ. Доля случаев с отрицательным результатом теста составила 33,1%.

Далее оценивали долевое участие разных кишечных вирусов в этиологии ОГЭ у детей разных возрастных групп – 0-6, 7-12, 13-24 и 24-60 месяцев. Было отмечено примерно двукратное снижение эффективности расшифровки этиологии ОГЭ для детей в возрасте 0-6 месяцев - доля негативных образцов для этой возрастной категории составила 57,8% в сравнении с 23-25% для более старших детей (Таблица 31).

Отмечено значительное увеличение доли ротавирусов (42,4%) и норовирусов (13,7%) в структуре ОГЭ в холодный период года (ноябрь-апрель) (Таблица 32). Вместе с тем, доля ротавирусов в теплый период года (май-октябрь) также была высока – 33,9%.



Результаты мультиплексного ОТ-ПЦР-РВ анализа фекальных образцов. Отр – отрицательный результат; Смеш. – случаи смешанной инфекции.

Рисунок 26 - Структура кишечных вирусов, выявленных у детей с ОГЭ при их поступлении в стационары г. Москвы в период с 2009-2014 гг. (Панель К4, n=429)

В 38 из 42 исследованных образцов (90,5%), собранных летом от детей, не имевших признаков ОГЭ (Панель К6), не было выявлено вирусных НК. В 4 образцах была выявлены ДНК аденовирусов (2 случая, значения ПЦ 25,0 и 30,0) и РНК саповирусов (2 случая, значения ПЦ 23,3 и 27,3). Важно отметить, что при анализе части образцов Панели К4 от детей, госпитализированных с ОГЭ в стационар летом 2010 г. (n=42), кишечные вирусы определились в 67,7% случаях, тогда как в образцах, собранных в тот же сезон от здоровых детей (n=42), – только в 9,5% случаев (Рисунок 27). Примечательно, что у детей, госпитализированных летом 2010 года, была зарегистрирована высокая доля ротавирусной инфекции в общей структуре ОГЭ (35,7 %, Рисунок 27Б), что не характерно для летних месяцев в районах с умеренно-континентальным климатом.

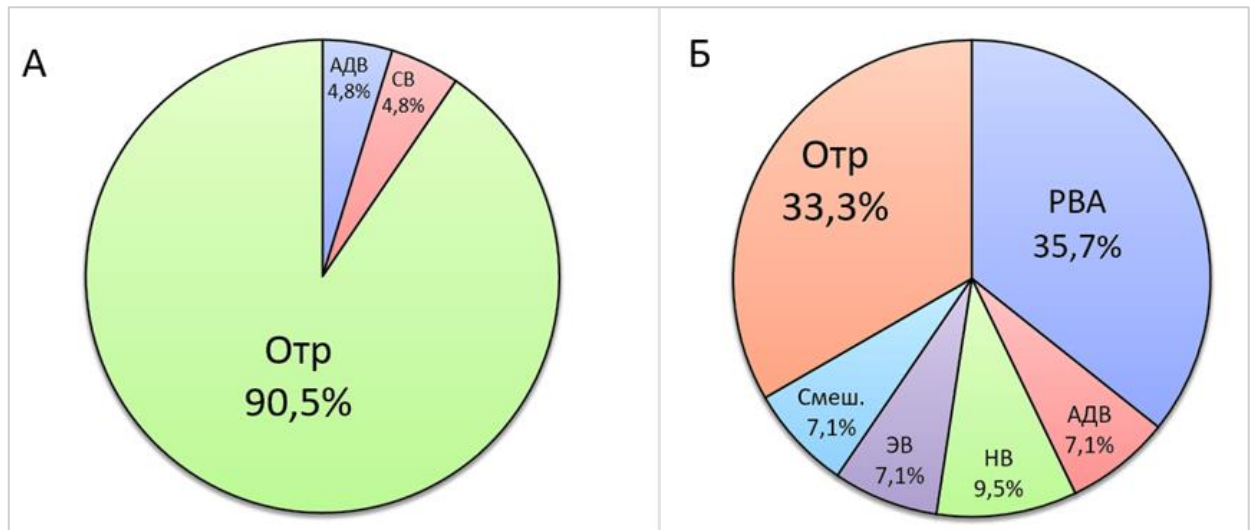
Таблица 31 - Структура кишечных вирусов, выявленных у детей разных возрастов (Панель К4)

Возраст, мес.	Результат ОТ-ПЦР-РВ, %									Всего
	РВА	НВ	АДВ	АВ	СВ	ЭВ	ОРВ	Смеш. инфекция	Отр	
0-6 (n=104)	28,9	5,6	1,1	2,2	0,0	1,1	1,1	2,2	57,8	100,0
7-12 (n=107)	54,8	9,7	4,3	1,1	0,0	0,0	0,0	6,5	23,7	100,0
13-24 (n=103)	49,4	6,7	4,5	4,5	2,2	1,1	0,0	6,7	24,7	100,0
24-60 (n=115)	42,6	9,9	5,9	3,0	3,0	3,0	0,0	7,9	24,8	100,0

Таблица 32 - Структура кишечных вирусов, выявленных в образцах Панели К4 в течение холодного (ноябрь-апрель) и теплого (май-октябрь) периодов года

Сезон	Результат ОТ-ПЦР-РВ, %										
	РВА	НВ	АДВ	АВ	СВ	ЭВ	ОРВ	Смеш. инф.	Всего полож.	Отр.	Всего
Ноябрь-апрель n=314	42,4	13,7	3,8	1,6	1,6	0,3	0,0	6,4	69,8	30,2	100,0
Май-октябрь n=115	33,9	5,2	7,0	2,6	0,9	3,5	0,9	5,2	59,2	40,8	100,0

В 41 случае из 165 (24,9%) в образцах фекалий, взятых у госпитализированных детей повторно, было обнаружено появление либо присоединение нового вируса, что расценено как факт внутрибольничного инфицирования. В 22 случаях (52,4%) отмечалось внутрибольничное заражение ротавирусом, в 12 (28,6%) - норовирусом, в 3 (7,1%) – астровирусом, в 1 (2,4%) – аденовирусом. В четырех случаях (9,5%) отмечено внутрибольничное инфицирование сразу двумя или тремя вирусами. Между показателями долевого участия вирусов в структуре внутрибольничного инфицирования и долевого участия вирусов в структуре госпитализации с ОГЭ (Таблица 33) обнаружена прямая высокая (по шкале Чеддока) связь с линейным коэффициентом корреляции 0,94.



А. Здоровые дети (Панель К6, n=42); Б. Дети, госпитализированные с ОГЭ летом 2010 г. (n=42). Отр – отрицательные образцы; Смеш. – случаи смешанной инфекции.

Рисунок 27 - Сравнительный анализ структуры кишечных вирусов, выявленных летом 2010 года у здоровых и госпитализированных с ОГЭ детей

Таблица 33 - Сопоставление частоты выявления кишечных вирусов у детей, госпитализированных в стационар с ОГЭ, и в случаях внутрибольничного заражения

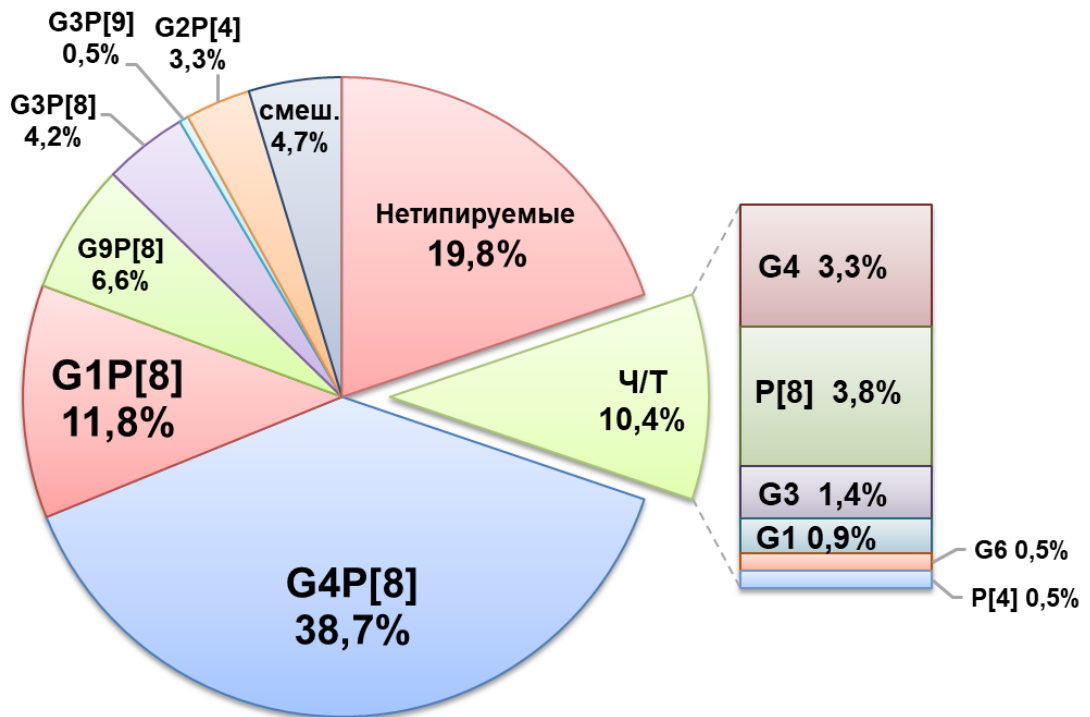
Вирус	Внутрибольничное инфицирование		Госпитализация с ОГЭ вирусной этиологии	
	Случаев	% от числа случаев	Случаев	% от числа случаев
РВА	21	52,4	172	62,55
НВ	12	28,6	49	17,82
АВ	3	7,1	8	2,91
АДВ	1	2,4	20	7,27
Смешанная инфекция	4	9,5	26	9,45
Всего	42	100	275	100,00

Возраст детей, у которых был подтвержден факт внутрибольничного инфицирования кишечными вирусами, был значительно меньше, чем у детей без такового (5 [3-9] против 13 [6-23] месяцев, Манна-Уитни:  $p=0,0007$ ). Клинические проявления в виде нарушения общего состояния, рвоты и диареи зарегистрированы у 78% (32 из 41) пациентов, причем в подавляющем большинстве случаев (96,9%) у детей с клиническими проявлениями внутрибольничной вирусной инфекции обнаруживались РВА (62,5%), или НВ (25,0%), или оба вируса (9,4%). У детей без клинических проявлений внутрибольничного инфицирования чаще обнаруживались АВ, АДВ, РВС и ОРВ (4 из 9 наблюдений, условно 44,4%). Кроме того, вирусная нагрузка, определяемая по значениям ПЦ в ОТ-ПЦР-РВ, у детей с клиническими проявлениями была выше, чем у детей без клинических проявлений внутрибольничной инфекции (ПЦ=19,5 [16,1:22,5] против 26,9 [22,0-30,6], Манна-Уитни:  $p=0,01$ ). Таким образом, инфицирование кишечными вирусами в стационаре встречалось в 24,9% случаев, но сопровождалось клиническими проявлениями кишечной вирусной инфекции только в 19,4% случаев. Наличие клинических проявлений ассоциировалось с младшим возрастом и более высокой репликативной активностью вирусов. Данный вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

### 3.2.1.2. Распределение G/P-генотипов ротавирусов группы А, выявленных в Москве и Московской области в период с 2014 по 2009 гг.

С целью G/P-генотипирования ротавирусов в мультиплексной типоспецифической ОТ-ПЦР-РВ анализировали 172 клинических образца Панели К4, содержащих ротавирусную РНК, а также 40 образцов (Панель К5) с подтвержденным в иммунохроматографическом тесте содержанием ротавирусного антигена (всего 212 образцов). Для 170 образцов ротавирусов, выявленных в клинических образцах, был определен G/P-генотип, либо один из вариантов генов G или P (Рисунок 28). Показано, что доминирующим генотипом являлся G4P[8], выявленный в 48,2% случаев, тогда как частота выявления генотипов G1P[8], G2P[4], G3P[8],

G9P[8] была значительно ниже и варьировала от 14,7% до 4,1% (Рисунок 28). Примерно в 20% случаев, в основном в образцах с низкой концентрацией ротавирусной РНК, установить генотип ротавируса не удалось.

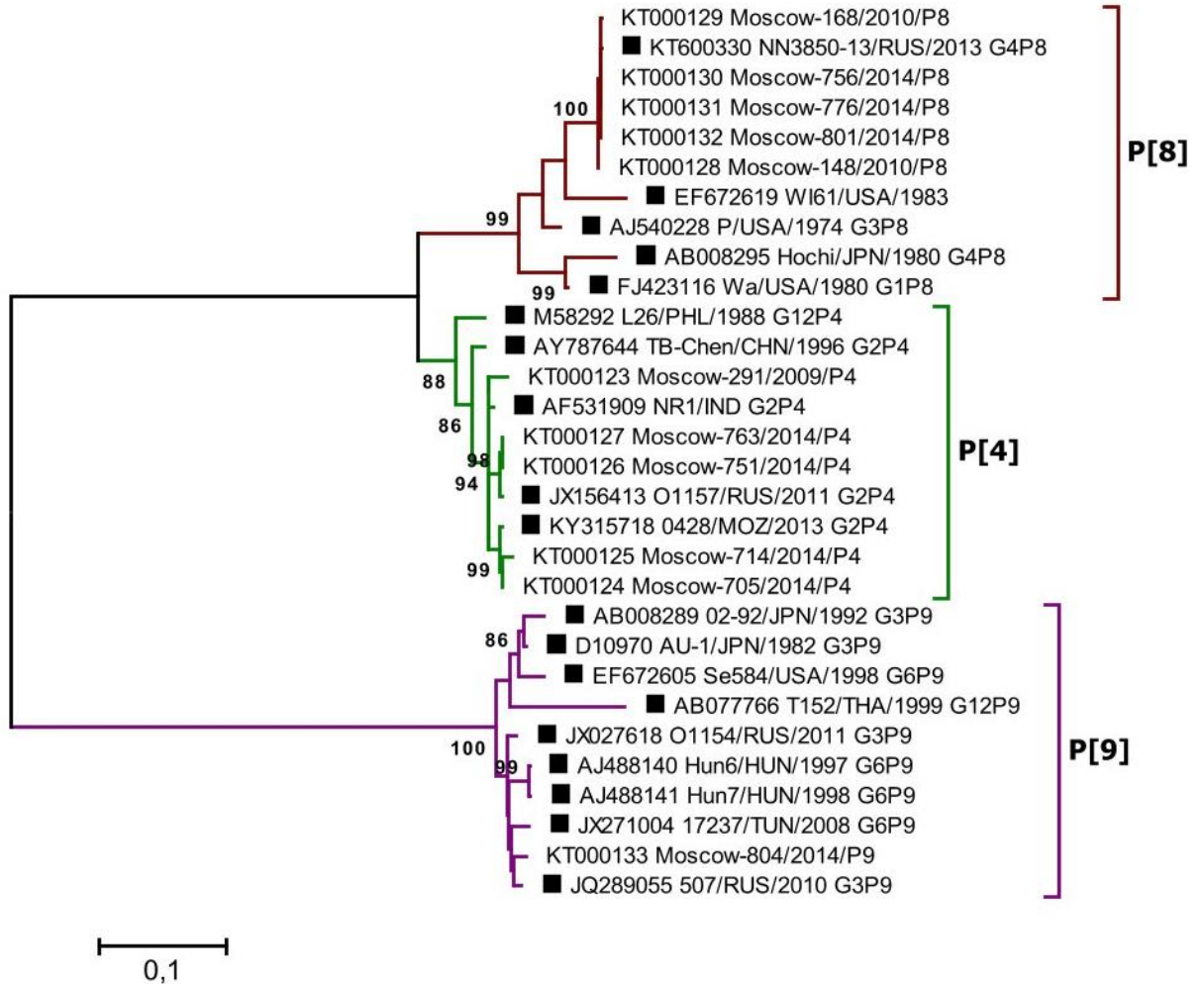


Смеш. – случаи смешанной инфекции; Ч/Т – определен только вариант гена G или P (частично типированные).

Рисунок 28 - Распределение G/P-генотипов РВА, циркулировавших в период 2009-2014 гг. в московском регионе (n=212), %

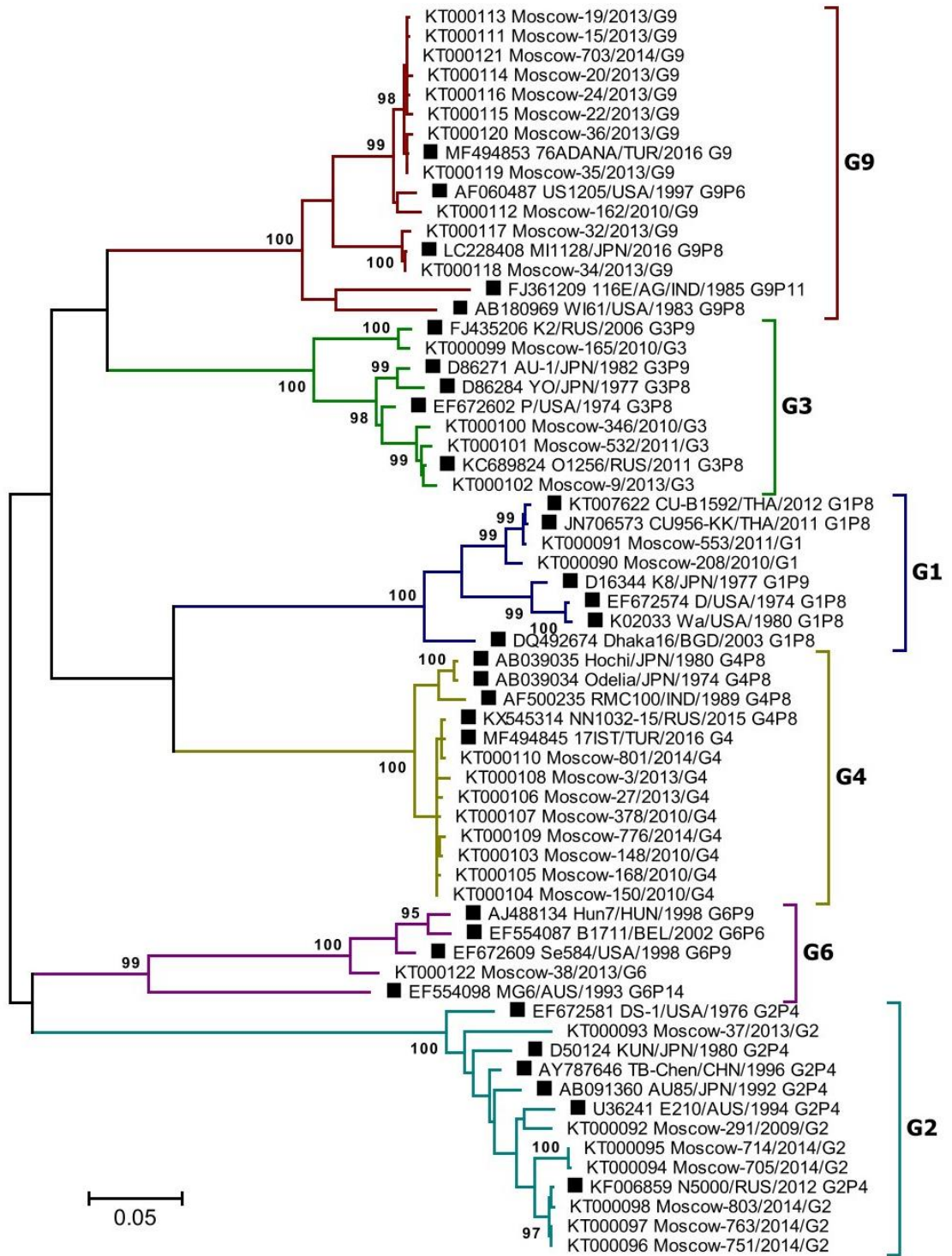
Достоверность получаемых в типоспецифической ПЦР-РВ данных подтверждали выборочным секвенированием фрагментов генов белков Р и G. Всего были определены 44 последовательности фрагментов генов (11 Р и 33 G, GenBank ID с KT000090.1 по KT000133.1). Для этого в реакции ПЦР получали фрагмент гена Р (сегмент 4) 660 п.н. и гена G 880 п.н. (сегмент 9). С целью установления таксономической принадлежности ротавирусов (определения вариантов генов Р и G) строили дендрограммы, используя метод максимального правдоподобия и двухпараметрическую эволюционную модель Kimura (Рисунки 29, 30).





Референсные штаммы помечены - ■. Название образцов РВА включает GenBank ID, место получения образца (Moscow), номер в лабораторном музее, год выделения и вариант гена, определенный в ПЦР-РВ. В названии референсных штаммов указан идентификационный номер GenBank, название штамма и генотип. Древо строили методом максимального правдоподобия, используя двухпараметрическую эволюционную модель Kimura. Надежность формирования узлов древа оценивали методом «бутстрэп»-анализа и выражали как процент от 500 альтернативных древ, поддерживающих данную группу.

Рисунок 29 - Дендрограмма, построенная на основе сравнения нуклеотидных последовательностей гена Р (640 п.н.) референсных штаммов и ротавирусов, выявленных в клинических образцах



Референсные штаммы помечены - ■. Название образцов РВА включает GenBank ID, место получения образца (Moscow), номер в лабораторном музее, год выделения и вариант гена, определенный в ПЦР-РВ. В названии референсных штаммов указан идентификационный номер GenBank, название штамма и генотип. Древо строили методом максимального правдоподобия, используя двухпараметрическую эволюционную модель Kimura. Надежность формирования узлов древа оценивали методом «бутстрэп»-анализа и выражали как процент от 500 альтернативных древ, поддерживающих данную группу.

Рисунок 30 - Дендрограмма, построенная на основе сравнения нуклеотидных последовательностей гена G (819 п.н.) референсных штаммов и ротавирусов, выявленных в клинических образцах

Из построенных древ видно, что типированные в ОТ-ПЦР-РВ клинические изоляты ротавирусов образовали общие кластеры с соответствующими по генотипу референсными штаммами. В большинстве случаев надежность формирования узлов древа, объединяющих определенный вариант гена, составляла от 96 до 100%. Единственным исключением явился кластер P[4], который образовал узел с надежностью 76%, что связано с тем, что для построения древа использованы небольшие по размеру фрагменты гена P[4] (640 п.н.). Вместе с тем, в 100% случаев исследуемые РВА кластеризовались в группы в соответствии с генотипом референсных штаммов и вариантами генов G и P, определенными в ОТ-ПЦР-РВ. Это свидетельствует о высокой точности генотипирования ротавирусов методом ОТ-ПЦР-РВ и достоверности получаемых данных.

Среди ротавирусов, генотип которых не удалось установить в ОТ-ПЦР-РВ, путем секвенирования выявлено два редких варианта генов – G6 (образец Moscow-38/2013) и P[9] (образец Moscow-804/2014).

По данным ВОЗ доля детей с ротавирусным энтеритом от общего числа госпитализированных с ОГЭ детей варьировала в 2010 г. в разных странах мира от 7 до 77 % при среднемировом уровне 40% [555]. В странах с широким охватом ротавирусной вакциной в последние годы этиологическая структура тяжелых ОГЭ значительно изменилась [556–558]. Так, к 2012 году в США доля детей младше 5 лет с ротавирусным гастроэнтеритом в общей структуре госпитализаций пациентов с ОГЭ снизилась с 21,0% до 2,9% по сравнению с довакцинальным уровнем (2002-2006 гг.) (подсчитано на основе данных Leshem E. с соавт., 2015) [557]. За тот же период частота госпитализации детей с ОГЭ любой этиологии снизилась на 55%, а с ротавирусной инфекцией упала на 94% [557]. Вместе с тем доля норовирусной инфекции в общей структуре ОГЭ, повлекших госпитализацию, возросла в странах с широким применением ротавирусной вакцины [559].

Полученные в нашем исследовании результаты подтверждают ведущую роль ротавирусов (40,1% от всех случаев) в этиологии случаев ОГЭ, потребовавших госпитализации в г. Москве в 2009-2014 гг. (без учета 6,1% случаев смешанной инфекции), что сопоставимо с довакцинальным периодом в странах, включивших вакцинацию против ротавирусной инфекции в НКИ. Второе и третье место в этиологической структуре ОГЭ в условиях московского региона принадлежит норовирусам и аденовирусам (11,4% и 4,7%, соответственно), что также соответствует существующим представлениям о роли этих вирусов в этиологии тяжелых гастроэнтеритов.

Мы выявили высокий уровень лабораторно-подтвержденных случаев внутрибольничного инфицирования кишечными вирусами – 24,9% от общего числа госпитализированных с ОГЭ детей. В структуре внутрибольничного инфицирования доминировали случаи ротавирусной (52,4%) и норовирусной (28,6%) инфекции, что согласуется с данными других авторов [560];

561]. Вероятно, именно высокая доля детей, поступающих в стационары с ротавирусной и норовирусной инфекцией, определяет их важнейшую роль в структуре нозокомиальной инфекции, что подтверждается наличием высокой прямой связи с линейным коэффициентом корреляции 0,93 между показателями долевого участия разных кишечных вирусов в этиологии ОГЭ и внутрибольничной инфекции.

Необычно высокая доля ротавирусной инфекции в общей структуре ОГЭ (35,7 %) была отмечена у детей, госпитализированных летом 2010 года, что не характерно для летних месяцев в районах с умеренно-континентальным климатом. Это, вероятно, связано с тем, что июле-августе 2010 года в Европейской части России регистрировалась аномально высокая температура 35-40°C, не имевшая аналогов за всю историю метеонаблюдений, что на фоне возникших пожаров сопровождалось загрязнением воздуха [562]. В условиях аномальной жары люди вынуждены были проводить много времени у открытых водоемов в местах массового купания, употреблять лёд из морозильника, что способствовало распространению ротавирусов. Примечательно, что в некоторых странах Центральной и Восточной Африки, отличающихся теплым климатом, подъем заболеваемости ротавирусным энтеритом у детей приходится именно на сухой или сухой и теплый сезоны года [563; 564].

Россия находится на пороге начала массовой вакцинопрофилактики ротавирусной инфекции. В этих условиях следует учитывать опыт других стран, где после введения вакцинации и снижения заболеваемости наблюдался значительный ее подъем, сопровождающийся изменением тяжести инфекции в других возрастных группах, что, вероятно, обусловлено сменой доминирующего генотипа среди циркулирующих ротавирусов [565; 566]. Признаки смены циркулирующих генотипов ротавирусов на фоне вакцинопрофилактики отмечены как в развивающихся, так и в развитых странах. Например, в Бангладеш в 2011-2012 гг. было отмечено нарастание доли ротавируса генотипа G9P[4] – полностью гетеротипичного по отношению к применяемым вакцинам [567]. В Бельгии на фоне массового применения вакцины Rotarix, основанной на штамме РВА с генотипом G1P[8], значительно увеличилась доля G2P[4] [568].

Именно поэтому актуально обсуждение и сопоставление распределения генотипов ротавирусов с учетом состава существующих ротавирусных вакцин. В глобальном масштабе применяются вакцины Rotarix («GlaxoSmithKline», Бельгия) и RotaTeq («Merck», США). Вакцина Rotarix представлена аттенуированным штаммом ротавируса человека G1P[8], тогда как RotaTeq состоит из 5 штаммов-реассортантов на основе бычьего ротавируса, каждый из которых включает ген VP7 (G1, G2, G3 and G4) или VP4 (P[8]) ротавируса человека. В настоящее время в мире в структуре циркулирующих геновариантов преобладают ротавирусы, гомотипичные или частично гетеротипичные по отношению к вакцинам Rotarix и RotaTeq - G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] [124], и г. Москва, как показано в настоящем

исследовании, не является исключением. Московский мегаполис является местом пересечения миграционных, деловых и туристических потоков, что должно определять существенное сходство по распределению генотипов ротавирусов с другими регионами Европы. И действительно, в структуре генотипов РВА в городах Европейской части России (Москва, Нижний Новгород, Санкт-Петербург, Челябинск) и ряде приграничных стран (Украина, Молдова) в 2010-2012 гг. доминировали генотипы G4P[8] и G1P[8] [569; 570].

Однако, в ряде регионов мира высока роль и полностью гетеротипичных по отношению к вакцинам геновариантов РВА (G9P[6], G9P[4], G8P[4] и др.) [126; 555; 567]. Несмотря на имеющиеся данные о перекрестной протективной активности ротавирусных вакцин, в том числе в отношении полностью гетеротипичных РВА [127; 128], нет сомнений в необходимости изучения антигенного разнообразия циркулирующих штаммов ротавирусов. В связи с этим особый интерес представляет циркуляция в московском регионе геновариантов Moscow-38/2013/G6 и Moscow-804/2014/P[9], поскольку в состав ротавирусных вакцин не входят компоненты G6 и P[9]. Наиболее близкими по нуклеотидной последовательности по отношению к этим геновариантам в базе данных GenBank являются штаммы с установленным генотипом G6P[9] (GenBank ID EF672609.1, AJ488134.1, AJ488140.1, AJ488141.1, JX271004.1 – 94-99% сходства) и G3P[9] (GenBank ID JQ289055.1, JX027618.1 – 98-99% сходства), то есть частично или полностью гетеротипичные по отношению к вакцинам Rotarix и RotaTeq, потенциально способные «ускользнуть» от поствакцинального иммунитета. С началом массовой вакцинопрофилактики ротавирусной инфекции на территории РФ подобные гетеротипичные геноварианты РВА могут получить преимущество над гомотипичными.

#### ***Сравнительная характеристика гастроэнтерита, вызванного ротавирусами генотипов G4P[8] и G9P[8]***

В апреле-мае 2013 г. было обследовано 40 детей от 6 мес. до 9 лет, госпитализированных в инфекционный стационар с клинической картиной инфекционной диареи с подтвержденным иммунохроматографическим экспресс-тестом диагнозом ротавирусный гастроэнтерит. Клиническая картина болезни была типичной у всех пациентов и характеризовалась повышением температуры тела, у 82,5% – проявлением интоксикации, у 80% – гипогидратации 1–2-й степени, у 62,5% – гемодинамическими нарушениями. Рвота и жидкий стул кратностью от единичных эпизодов до 15–20 раз в сутки в момент госпитализации наблюдались у 95,0 и 97,5% детей, соответственно, при этом в проведении инфузионной терапии нуждались 77,5% детей.

У госпитализированных в стационар детей методом типоспецифической ОТ-ПЦР-РВ выявлены РВА пяти генотипов: G4P[8] – 47,5%, G9P[8] – 30%, G1P[8] – 7,5%, G3P[8] – 2,5% и G2P[4] – 2,5% (Рисунок 31). Поскольку в структуре выявленных генотипов преобладали ротавирусы G4P[8] и G9P[8], нам представилось целесообразным провести сравнение

клинической картины гастроэнтерита, вызванного ими. G4P[8] был выделен у 19, а G9P[8] – у 12 детей. Группы детей, инфицированных G4P[8] и G9P[8], были сопоставимы по возрасту, частоте сопутствующей патологии, средним срокам госпитализации ( $2,11 \pm 0,23$  и  $2,42 \pm 0,29$  дней соответственно,  $p > 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни).

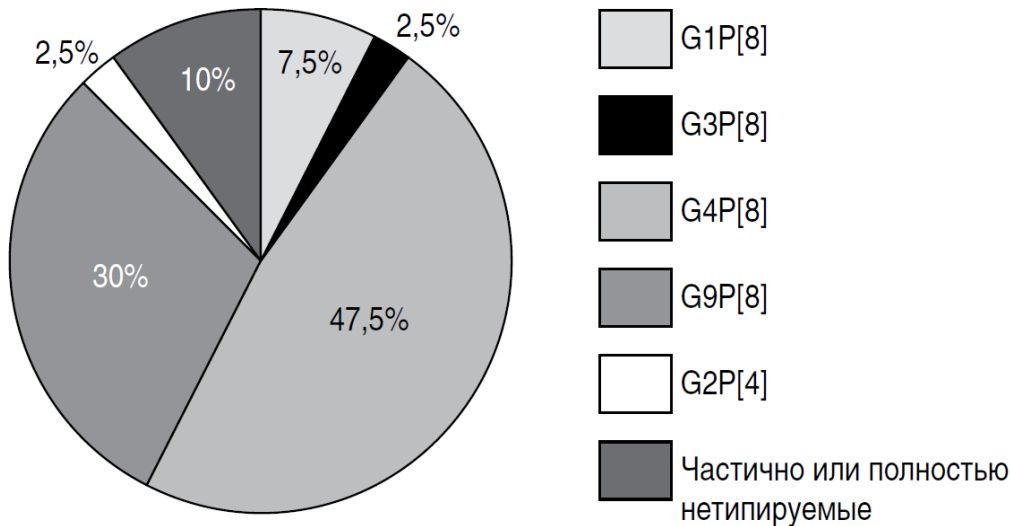


Рисунок 31 - Частота обнаружения (%) генотипов ротавирусов у детей, госпитализированных в инфекционный стационар (апрель-май 2013 г., n=40)

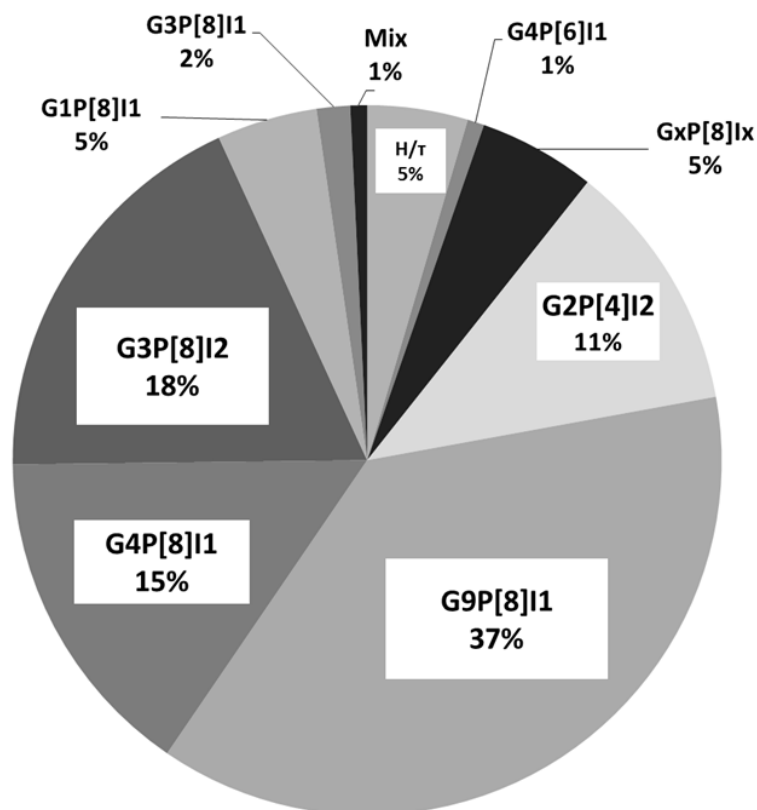
Увеличение доли G9P[8] в структуре генотипов циркулирующих РВА не сопровождалось более тяжелым течением ОГЭ у пациентов, госпитализированных в стационар. Вместе с тем, проведенное исследование позволило выявить различия в клинической картине гастроэнтерита, вызванного РВА разных генотипов. У подавляющего большинства пациентов группы G9P[8] рвота была редкой и не превышала 5 раз в сутки: 81,8 против 47,4% в группе G4P[8],  $p > 0,05$  (U-критерий Манна-Уитни). Частота рвоты и признаков кишечного синдрома (вздутие живота, урчание по ходу кишечника, боли в животе) и средняя частота стула с кратностью от 1 до 20 раз в сутки, патологические примеси в стуле, средняя продолжительность симптомов заболевания в сравниваемых группах не имели различий. В то же время, признаки интоксикации в группе G4P[8] регистрировались достоверно чаще (100 против 66,7% в группе G9P[8],  $p < 0,01$ , U-критерий Манна-Уитни). Средняя кратность рвоты была достоверно выше у детей с генотипом G4P[8] ( $7,0 \pm 1,3$  против  $3,5 \pm 0,9$  раз/сут в группе с G9P[8],  $p < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни). Кроме того, биохимическое исследование крови показало, что увеличение АсАТ (до 2–5 норм) достоверно чаще регистрировалось в группе с генотипом G4P[8] (76,5% против 20% соответственно,  $p < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни).

Таким образом, гастроэнтерит у госпитализированных в стационар детей, вызванный относительно новым для московского региона генотипом G9P[8], протекал с меньшей частотой интоксикации и кратностью дефекаций, чаще на фоне отягощенного преморбидного состояния

(аномалии развития и патология желудочно-кишечного тракта). Совокупность клинических показателей в группе G9P[8]: преобладание детей первого года жизни, высокая частота аномалий развития и патологии желудочно-кишечного тракта, сравнительно низкая частота интоксикации и большее число пациентов с редкими рвотой и кратностью дефекаций может быть признаком меньшей вирулентности указанного генотипа в сравнении с доминирующим G4P[8].

### 3.2.1.3 Молекулярно-генетические особенности ротавирусов группы А, выявленных в Москве и Московской области в период с 2015 по 2020 гг.

Всего на наличие РНК или антигена РВА было проанализировано 289 фекальных образцов (Панель К7), собранных у детей, госпитализированных с симптомами ОГЭ в стационар в период с 2015 по 2020 гг. В 131 (45%) случае была обнаружена РНК РВА, которую в дальнейшем использовали для G/P-генотипирования методом ОТ-ПЦР-РВ и/или секвенированием. В 118 случаях (90,1%) был определен G/P-генотип РВА, в 7 случаях (5,3%) РВА был типирован только по гену Р, тогда как в 6 случаях (4,6%) генотип установить не удалось (Рисунок 32) [594].

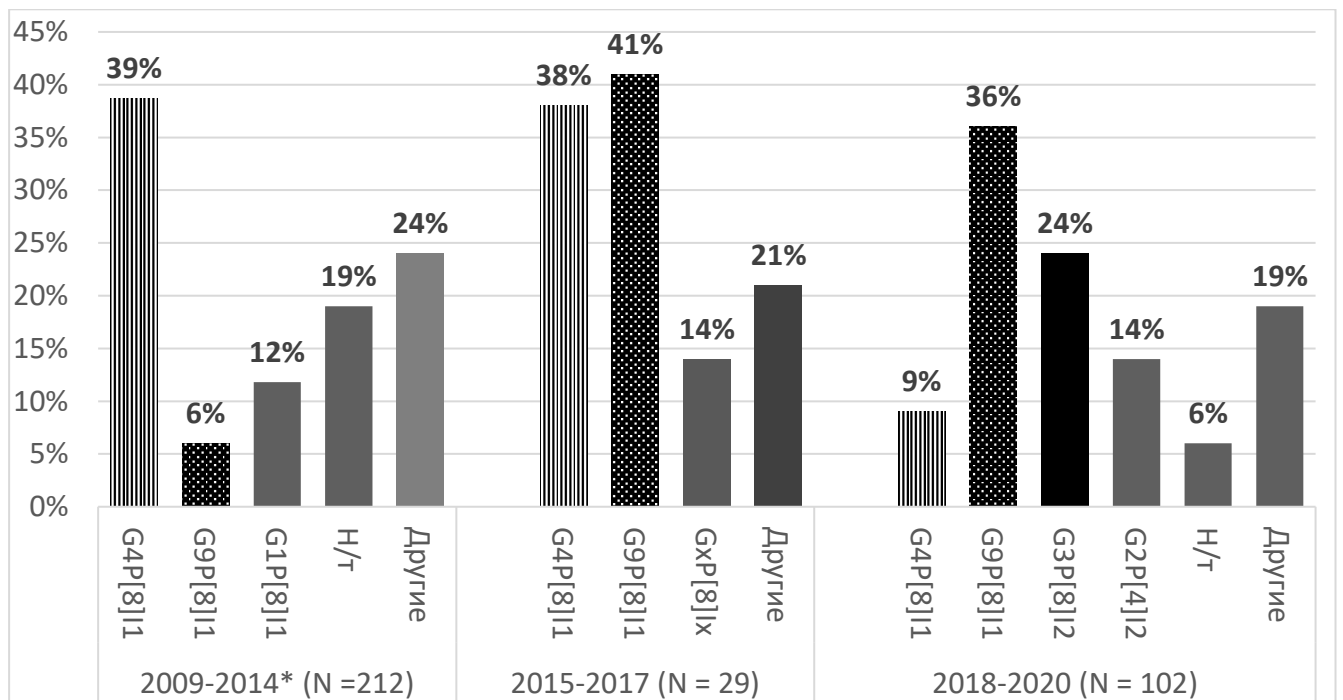


GxP[8]Ix – частично типированные РВА; Mix – случаи смешанной инфекции; H/г – нетипируемые геноварианты.

Рисунок 32 - Распределение G/P-генотипов РВА, выявленных в московском регионе в период с 2015 по 2020 гг. (n=131)

В период с 2015 по 2020 гг. РВА с генотипом G9P[8]I1 доминировали в общей структуре – 37%, второе место занимали G3P[8]I2 (новый DS-1-подобный геновариант) – 18%, далее - G4P[8]I1 – 15%, G2P[4]I2 – 11%, G1P[8]I1 – 5%, G3P[8]I1 – 2%. В семи случаях (5%) РВА, типированные только по гену P, относились к варианту гена P[8]. Также был обнаружен единичный случай смешанной инфекции (G9P[8]I1 и G2P[4]I2), и РВА с редким генотипом G4P[6]I1 [594].

На Рисунке 33 представлено распределение выявленных в московском регионе генотипов РВА по годам. Доля генотипа G9P[8]I1 в последние годы значительно возросла и в период с 2015 по 2020 гг. варьировала в пределах 36-41%. В то же время, снизилась частота встречаемости генотипа G4P[8]I1 с 38% до 9%, а частота встречаемости генотипа G2P[4]I2 возросла до 14% [594].



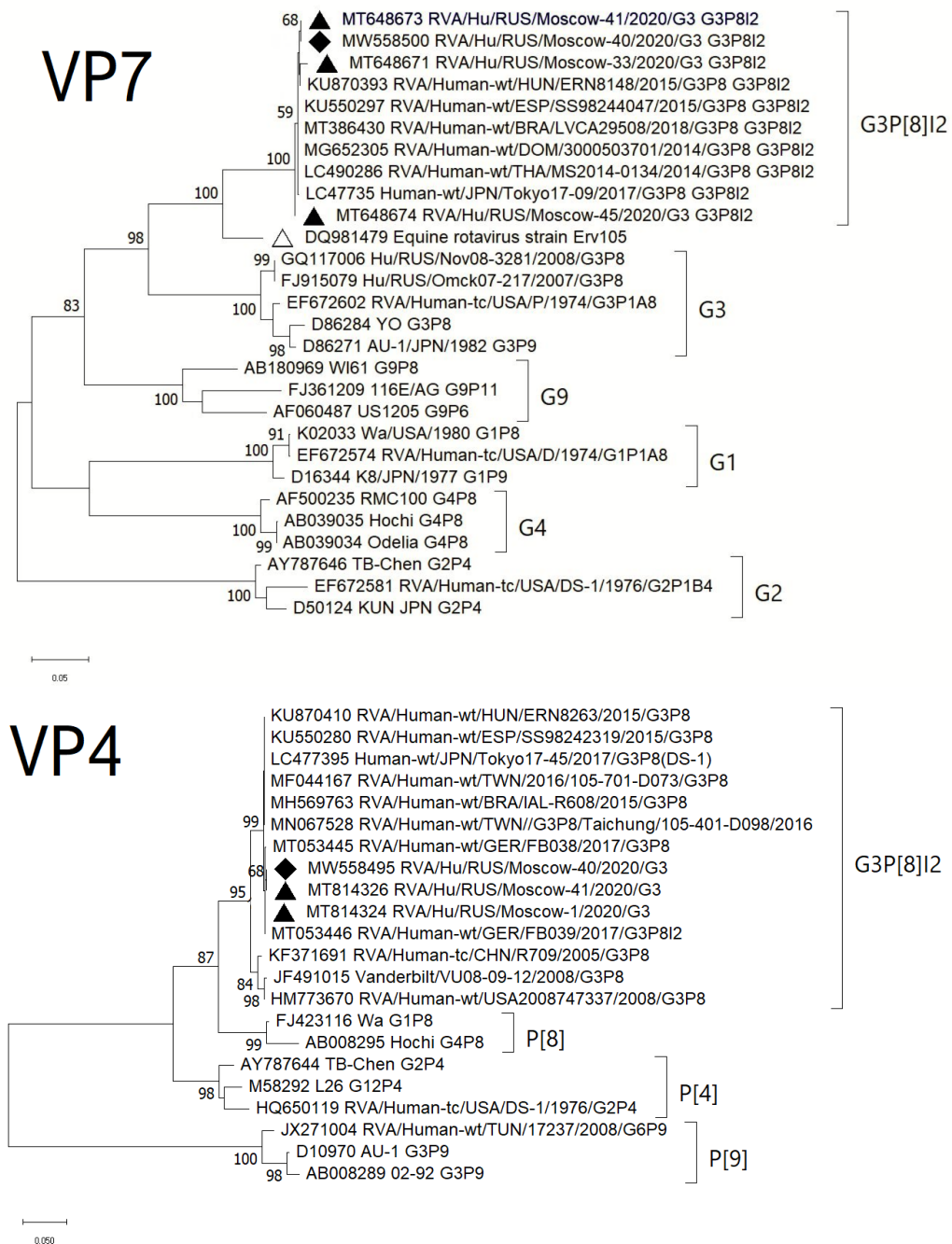
Н/т – нетипируемые РВА.

Рисунок 33 - Распределение G/P-генотипов, выявленных в Москве за 10 лет наблюдения (2009-2020 гг.)

Важно отметить, что для G/P-генотипирования РВА с генотипом GxP[8]I2 требовалось частичное секвенирование гена G, поскольку лабораторной тест-системой на основе ОТ-ПЦР-РВ установить вариант их G-гена не удалось. Секвенирование и филогенетический анализ последовательностей генов G (GenBank ID MT648671, MT648673, MT648674, MW558500) и P



(MT814324, MT814326, MW558495) в случаях обнаружения геновариантов GxP[8]I2 показали, что они принадлежат к генотипу G3P[8]I2 (Рисунок 34) [594].



Сегменты, секвенированные по Сэнгеру, отмечены значком ▲; ген, секвенированный методом НПС, отмечен значком ◆, ген белка VP7 РВА лошади отмечен значком △. Для обозначения РВА использовали GenBank ID, названия штаммов и G/P-генотип [594].

Рисунок 34 - Филогенетические деревья, основанные на последовательностях генов белков VP4 и VP7 нового геноварианта РВА с генотипом G3P[8]I2

Анализ полученных последовательностей показал, что отсутствие сигнала при генотипировании РВА с генотипом G3P[8]I2 методом ОТ-ПЦР-РВ связано с неполной гомологией нуклеотидных последовательностей гена G и соответствующего зонда. На

нетипируемых образцах РВА с генотипом GxP[8]I2 была также проведена моноспецифическая ПЦР с праймерами к G3 с электрофоретической детекцией результата, которая выявила ампликоны ожидаемой подвижности во всех образцах (данные не представлены), что подтвердило их принадлежность к генотипу G3P[8]I2 [594].

BLAST-анализ и филогенетический анализ продемонстрировали сходство секвенированных генов VP7 и VP4 с аналогичными генами РВА с новой G3-DS-1-подобной констелляцией, выявленных в разных странах мира. Ранее G3-DS-1-подобные РВА были обнаружены в Австралии (2013) [571], Испании (2014-2015) [572], Венгрии (2016) [573], Бразилии (2016) [574], Индонезии (2016) [575], России (2019) [576] и в других странах (Рисунок 34) [594].

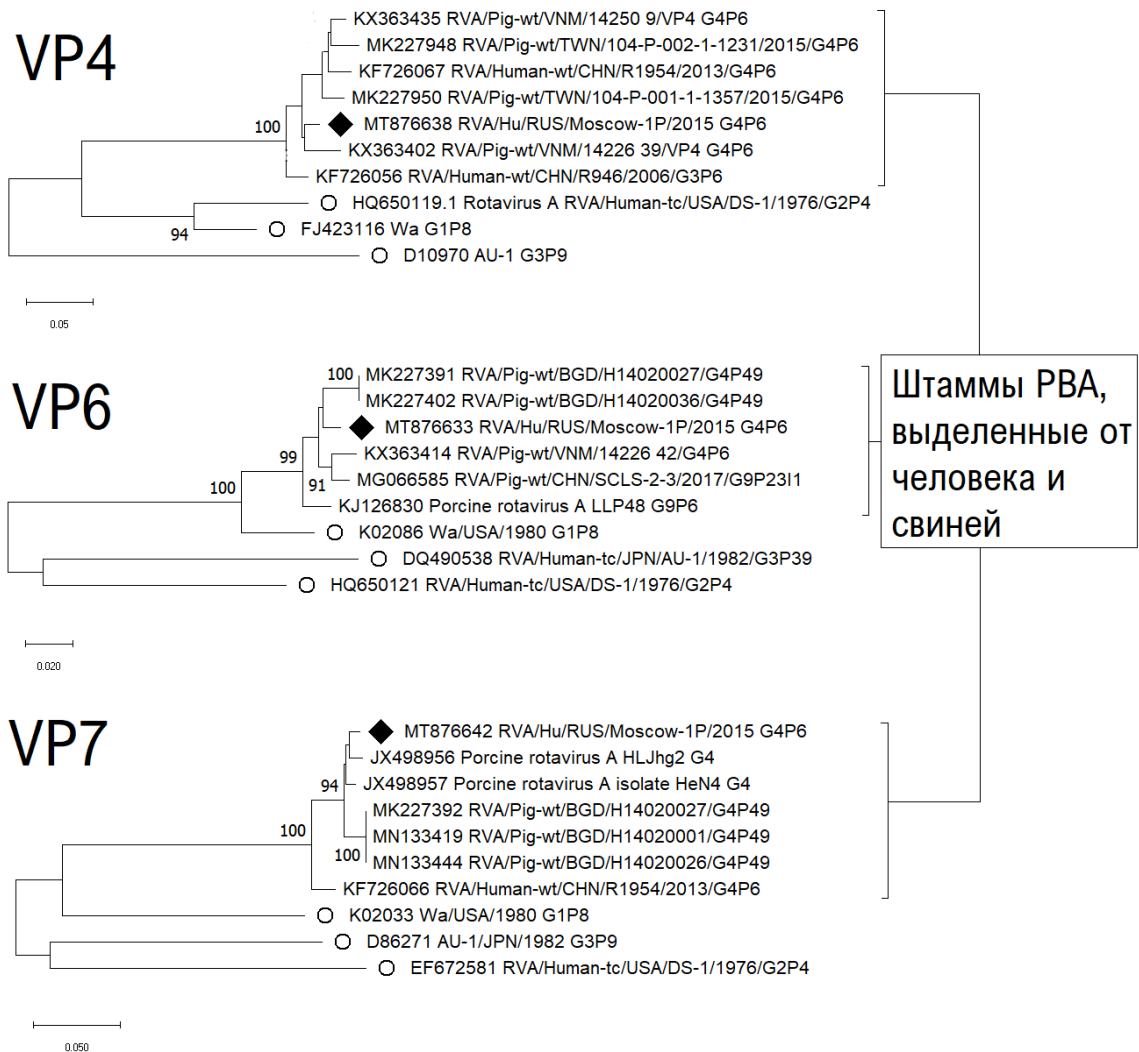
Далее было проведено НПС генома изолята Moscow-40/2020 с генотипом G3P[8]I2 (Таблица 34), в результате которого были идентифицированы варианты генов 10 сегментов генома (GenBank ID с MW558493 по MW558502). Проведенный BLAST-анализ показал высокую (91-99,8%) степень сходства генома изолята Moscow-40/2020 с последовательностями референсного штамма RVA/Human-wt/THA/SKT-281/2013/G3P[8] с генотипом G3-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2, выявленного в 2013 г. в Таиланде (GenBank ID с LC086714 по LC086724) [594].

Таблица 34 - Результаты НПС генома РВА с генотипом G4P[6]I1 и G3P[8]I2

Сегмент	Вирусный белок	Moscow-1P/2015, G4P[6]I1			Moscow-40/2020, G3P[8]I2		
		Количество прочтений	Покрытие сегмента, %	Генотип	Количество прочтений	Покрытие сегмента, %	Генотип
1.	VP1	1372	100	R1	12792	100	R2
2.	VP2	3795	100	C1	11193	100	C2
3.	VP3	1995	100	M1	-	-	Mx
4.	VP4	633	20	P[6]	2785	100	P[8]
5.	NSP1	546	100	A1	53841	100	A2
6.	VP6	15187	100	I1	16479	100	I2
7.	NSP3	14566	100	T1	80554	100	T2
8.	NSP2	175	36	N1	40022	100	N2
9.	VP7	1465	100	G4	25059	100	G3
10.	NSP4	-	-	Ex	10222	100	E2
11.	NSP5/6	77	100	H1	11351	100	H2

Редкий геновариант Moscow-1P/2015 с генотипом G4P[6]I1 был обнаружен в клиническом образце, взятом у 8-летнего ребенка с ОГЭ в 2015 году. Методом типоспецифической ОТ-ПЦР-РВ удалось установить только вариант гена P[6]. Секвенирование методами Сэнгера и НПС позволило установить генотип этого вируса по 10 генам: G4-P6-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-Ex-H1

(GenBank ID с MT876633 по MT876642, MG271938), что соответствует 81,7% генома (Таблица 34). Филогенетический анализ генов VP7, VP6 и VP4 РВА Moscow-1P/2015 (Рисунок 35) демонстрирует высокую степень сходства генов анализируемого вируса с генами РВА свиней (GenBank ID: VP4 - KX363402, MK227950, KX363435, MK227948; VP6 - MK227391, MK227402, KX363414, MG066585, KJ126830; VP7 - JX498957, JX498956, MK227392, MN133419, MN133444), либо РВА, выявленных у человека, но имеющих доказанное происхождение от РВА свиней (например, штамм RVA/Human-wt/CHN/R1954/2013/G4P[6], GenBank ID: с KF726066 по KF726076, KF726056) [552, 594].



Для обозначения РВА использовали GenBank ID, названия штаммов и G/P-генотип. РВА Moscow-1P/2015 (G4P[6]I1) отмечен знаком ◆, референсные штаммы Wa, AU-1, DS-1 отмечены знаком ○. В сравнении использованы гены РВА свиней, филогенетически наиболее близких геноварианту Moscow-1P/2015 согласно BLAST-анализу.

Рисунок 35 - Филогенетические деревья, основанные на сравнении последовательностей генов белков VP4, VP7 и VP6

BLAST-анализ остальных 7 генов также демонстрирует высокую степень сходства (от 92% до 98%) нуклеотидной последовательности со штаммами РВА свиней. Таким образом, филогенетический анализ свидетельствует о высокой вероятности происхождения РВА Moscow-1P/2015 (G4P[6]) от РВА свиней.

Полученные нами результаты свидетельствуют о существенных изменениях, произошедших в распространенности генотипов и серотипов РВА, циркулирующих в московском регионе. Согласно данным предыдущих исследований [130; 135], до 2015 года большинство РВА, циркулировавших в разных регионах РФ, относилось к генотипу G4P[8]. Наши данные свидетельствуют о постепенном снижении встречаемости данного генотипа в московском регионе с 38% до 9% в период 2017 по 2018 гг., при этом доля генотипа G9P[8] увеличилась до 36-41%. Это соответствует данным независимых исследований, проводившихся в Москве [576; 577], Нижнем Новгороде [570; 578] и Оренбурге [579]. Однако, важно отметить, что мы исследовали клинические образцы только от детей, госпитализированных с ротавирусным энтеритом, поэтому реальная структура генотипов РВА может отличаться от полученных данных, поскольку в исследовании не участвовали пациенты с ОГЭ, протекающим в легкой форме, не требующим госпитализации. В связи с этим, важно отметить, что ранее мы выявили штаммовые различия в вирулентности РВА с разными генотипами [580].

Особый интерес представляет РВА с генотипом G3P[8]I2, впервые выявленный нами в 2018 году. В период с 2018 по 2020 гг. его доля в общей структуре РВА составила 24%, что меньше только чем у генотипа G9P[8]I1 – 36% (Рисунок 33). По результатам секвенирования и филогенетического анализа (Рисунок 34) мы предположили, что G3P[8]I2 является родственным реассортантному штамму, впервые выявленному в Таиланде в 2013 г. [575] и широко распространившемуся в последние годы на территории Европы, Азии и Австралии [552; 572; 581; 582]. Данный штамм имеет DS-1-подобную констелляцию генов (G3-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2), за исключением гена белка VP7, который, в обычных для данной констелляции случаях, представлен геновариантом G2, в то время как для геноварианта G3 более характерна Wa-подобная констелляция [583]. По предположению ряда исследователей, геновариант G3P[8]I2 образовался в результате реассортации человеческого DS-1-подобного ротавируса и штамма РВА лошадей Erv105 (номер GenBank: DQ981479.1), поскольку с геном белка VP7 этого штамма выявлено наибольшее сходство [571; 572; 575]. При выполнении настоящего исследования мы, как и другие научные группы, столкнулись с невозможностью генотипировать новый РВА с генотипом G3P[8]I2 методом типоспецифической ПЦР [572]. Тест-система собственной разработки [135], как и праймеры предложенные ВОЗ [134], не смогли выявить G-ген штамма G3P[8]I2. В то же время секвенирование по Сэнгеру и проведенный BLAST-анализ позволили достоверно определить геновариант как G3. Из-за

точечных мутаций в генах G и P типоспецифические праймеры ПЦР все чаще не могут идентифицировать их вариант [142]. Этот факт повышает значимость методов секвенирования в эпидемиологическом мониторинге ротавирусной инфекции [594].

По данным Референс-центра по мониторингу ОКИ на базе ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, распространение РВА с генотипом G3P[8] на территории РФ продолжилось в 2021-2023 гг. Уже в 2022 году сформировалось доминирование РВА с генотипом G3P[8], при этом в 2023 г. доля G3P[8] продолжила увеличиваться [584], что согласуется с результатами мониторинга ротавирусной инфекции на территории Нижегородской [585; 586] и Свердловской области [587].

Ещё один нетипичный РВА Moscow-1P/2015 с генотипом G4P[6]I1, выявленный в единичном случае, вероятно, также является результатом реассортации РВА человека и животных, либо полностью имеет животное происхождение. В данном случае неясно, произошло ли заражение данным вирусом в результате передачи от человека к человеку, либо человек заразился вирусом от животных. По данным литературы, доля РВА с генотипом G4P[6]I1 в общей структуре выявляемых у человека РВА невысока. Это может быть свидетельством какого-то ограничения для распространения G4P[6]I1 в человеческой популяции, например, видового барьера, если предположить, что это штамм животного происхождения. В то же время, следует принимать во внимание, что в большинстве подобных исследований обследованы дети, госпитализированные с ротавирусным энтеритом, тогда как случаи заболевания с легким течением не рассматриваются. Поэтому мы не можем по этим данным судить о реальной распространённости того или иного геноварианта РВА [594]. Ротавирусы свиней филогенетически близки РВА человека [581], поэтому сложно установить, является ли исследуемый вирус следствием прямой передачи или реассортации [588–590]. Случаи реассортации или прямой межвидовой передачи РВА с генотипом G4P[6]I1 были описаны ранее как в Азии [548; 574; 591], так и в Европе [592].

В период с 2015 по 2020 гг. в генетической структуре РВА, циркулирующих на территории московского региона, произошли существенные изменения: снизилась встречаемость генотипа G4P[8]I1, который занимал лидирующую роль в предыдущие годы; в то же время выросло количество случаев госпитализации с РВИ, вызванной генотипом G9P[8]I1. Также в исследуемый период отмечено появление РВА предположительно животного происхождения, как в единичных случаях (G4P[6]I1), так и в значительном количестве (реассортантный G3P[8]I2), что является свидетельством важной роли межвидовой трансмиссии в эволюции РВА, патогенных для человека. Проведенное нами исследование подчеркивает необходимость постоянного эпидемиологического мониторинга ротавирусной инфекции с целью своевременного выявления новых реассортантов РВА животных и человека,

«ускользающих» от естественного и поствакцинального иммунитета. Выявленные нами и рядом авторов РВА, нетипируемые методом ОТ-ПЦР-РВ (генотипы G3P[8]I2 и G4P[6]I1), подчеркивают необходимость выборочного секвенирования генов РВА и оптимизации последовательностей праймеров для типоспецифической ОТ-ПЦР-РВ [548; 572; 594].

*Материалы раздела 3.2.1 опубликованы [135; 580; 593–595].*

### **3.2.2 Исследование генетического разнообразия клинически значимых папилломавирусов, циркулирующих на территории Российской Федерации**

ВПЧ-инфекция является серьезной медицинской проблемой. ВПЧ инфицируют клетки базального слоя эпителия, что приводит к их неконтролируемому размножению, последствием чего может быть появление папиллом, остроконечных кондилом, а также возникновение злокачественных опухолей различной локализации [93; 94]. Среди ВПЧ наибольшую клиническую значимость имеют представители рода *Alphapapillomavirus*, в том числе канцерогенные для человека 13 типов ВПЧ-ВР, принадлежащих к видам *Alphapapillomavirus 5* (ВПЧ51), *Alphapapillomavirus 6* (ВПЧ56), *Alphapapillomavirus 7* (ВПЧ18, 39, 45, 59, 68) и *Alphapapillomavirus 9* (ВПЧ16, 31, 33, 35, 52, 58), и по крайней мере семь других филогенетически родственных типов (ВПЧ26, 53, 66, 67, 70, 73, 82) относятся к потенциально канцерогенным типам [90]. В диагностике ВПЧ-инфекции важна также идентификация ВПЧ-НР - возбудителей доброкачественных генитальных кондилом, относящихся к виду *Alphapapillomavirus 10* - ВПЧ6, 11, 13, 44 [86].

Точные сведения о распространённости ВПЧ-инфекции в России отсутствуют, так как официально регистрируются лишь некоторые из её клинических проявлений, а имеющиеся сведения основаны на результатах выборочных исследований и расчётных показателях. В России ранее проводились исследования по оценке распространённости типов ВПЧ, однако они в основном были ограничены одной областью, небольшим количеством дифференцируемых типов ВПЧ-ВР, или в них не учитывались ВПЧ-НР [91; 596–599]. Так, использованные тест-системы позволяли дифференцировать ограниченное количество типов ВПЧ-ВР (от 8 до 12 типов), что не охватывает всего разнообразия клинически значимых ВПЧ. Обобщение данных этих работ затруднительно, поскольку в них использованы разные тест-системы, отличающиеся как по количеству, так и по набору дифференцируемых ВПЧ типов. Наиболее информативным представляется опубликованное в 2019 г. исследование Донникова А.Е. с соавт., которое охватывает большую выборку пациентов, проживающих в РФ, обследованных в 2010-2016 гг. на широкий спектр типов ВПЧ [600].

Генотипирование ВПЧ, выявленных у пациентов, позволяет оценить риск развития дисплазии эпителия пораженных вирусом тканей и прогнозировать развитие заболевания. По

данным ВОЗ на 2019 год 100 стран мира ввели ВПЧ-вакцину в НКИ. В России ВПЧ-вакцина пока не входит в НКИ, что определяет актуальность исследования генетического разнообразия ВПЧ как с точки зрения прогнозирования эффективности существующих вакцин различного состава, так и при разработке отечественной ВПЧ-вакцины. Целью настоящего исследования была оценка распространенности ВПЧ-ВР и ВПЧ-НР на территории РФ с учетом возрастных, половых и региональных особенностей.

В течение 2019 года было проведено лабораторное обследование 12945 пациентов с подозрением на ВПЧ-инфекцию, обратившихся в медицинские центры различных регионов РФ, по результатам которого ДНК ВПЧ выявлена в 5013 случаях (38,7%). Важно отметить, что у 3057 пациентов выявлена моноинфекция ВПЧ, тогда как у 1956 пациентов - смешанная инфекция (два и более типа ВПЧ), поэтому при общем количестве ВПЧ-положительных пациентов равном 5013, количество положительных находок (ВПЧ разных типов) составило 8583.

Анализ возрастной структуры обследованных пациентов показал, что положительные находки наиболее часто встречаются у самой мобильной, работоспособной и сексуально-активной группы населения - лиц 20-29 и 30-39 лет, затем в возрастной группе 40-49 лет (Таблица 35), что согласуется с данными de Martel С. [95].

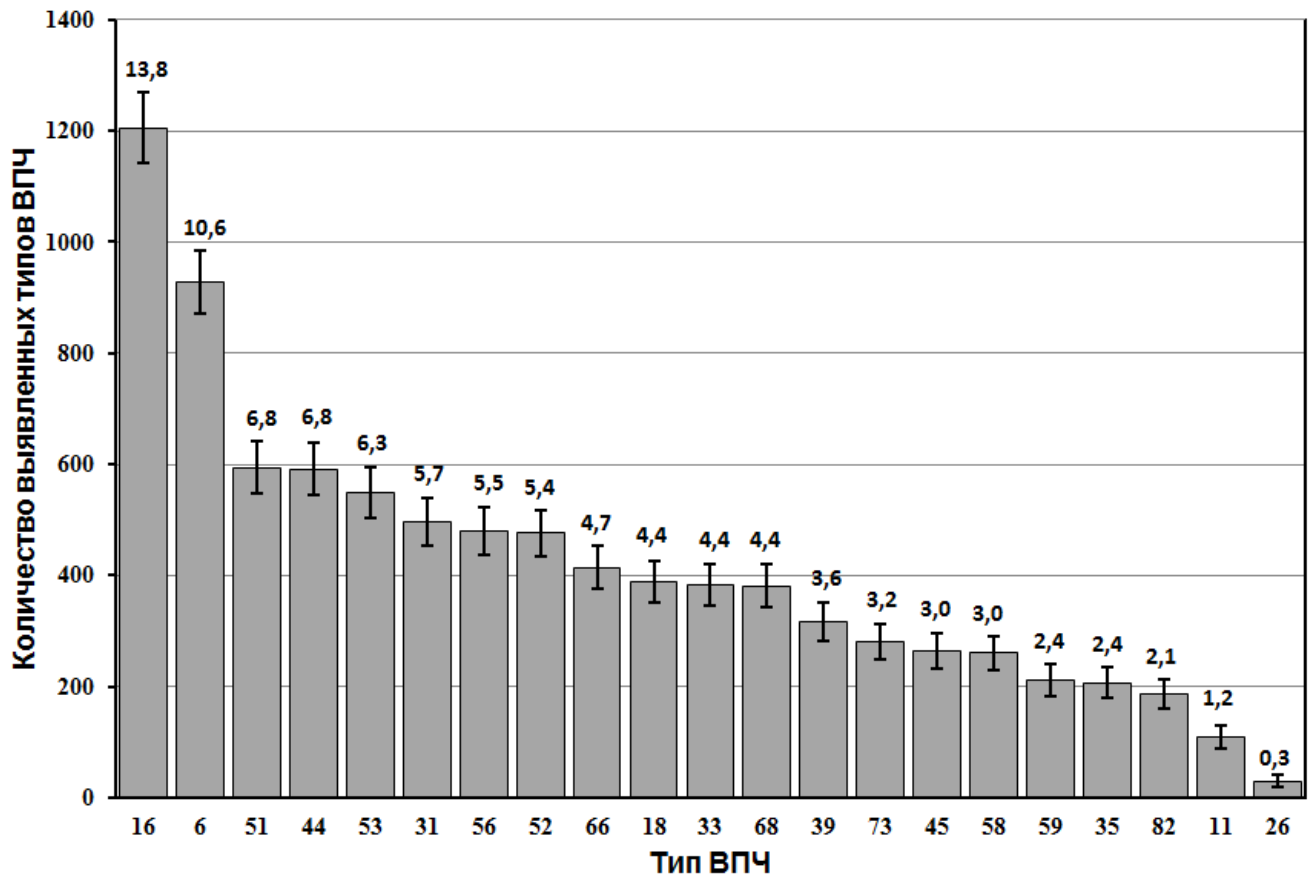
Таблица 35 - Возрастно-половая структура пациентов с положительным результатом анализа на ДНК ВПЧ, % (95% ДИ)

Пациенты	Возрастные группы, лет						
	0-14 (n=10)	15-19 (n=345)	20-29 (n=4346)	30-39 (n=2743)	40-49 (n=803)	50-59 (n=243)	60+ (n=93)
Все пациенты (n=5013)	0,1 (-1,8-2,0)	2,8 (1,1-4,5)	44,6 (43,1-46,1)	35,8 (34,0-37,6)	11,7 (9,5-13,9)	3,7 (1,3-6,1)	1,3 (-1,0-3,6)
Женщины (n=4488)	0,1 (-1,8-2,0)	3,1 (1,3-4,9)	46,1 (44,6-47,6)	34,9 (33,1-36,7)	11,1 (8,9-13,3)	3,5 (1,2-5,8)	1,2 (-1,0-3,4)
Мужчины (n=525)	0,2 (-2,5-2,9)	0,4 (-0,3-1,1)	31,8 (30,4-33,2)	43,6 (41,7-45,5)	17,1 (14,5-19,7)	5,0 (2,3-7,7)	1,9 (-0,9-4,7)

В настоящем исследовании доля обследованных лиц в возрасте 20-39 лет составляет 80,4%, что закономерно совпадает с пиком половой активности человека и обращений к врачу с заболеваниями, передаваемыми половым путем. Необходимо отметить, что встречаются положительные находки и среди детей в возрасте от 0-14 лет, а также пожилого населения 60 и старше лет, однако их удельный вес значительно меньше - 0,1 и 1,3%, соответственно. Установлено, что среди женского населения частота обращения к врачу с ВПЧ-инфекцией в 8,5 раз выше (n=4488), чем среди мужского населения (n=525). Самый высокий уровень обращений

к врачу с ВПЧ-инфекцией отмечается как у мужчин, так и у женщин в возрастных группах 20-29 (31,8 и 46,1% соответственно), 30-39 (43,6 и 34,9% соответственно) и 40-49 лет (17,1 и 11,1% соответственно), самые низкие - в возрасте 0-14 лет (0,2 и 0,1% соответственно) и 60 лет и старше (1,9 и 1,2% соответственно). Необходимо также отметить, что у женского населения в возрастной группе 20-29 лет удельный вес положительных находок превышает таковой среди мужского населения в 1,44 раза, а в группе 15-19 лет – в 7,75 раз, что может быть обусловлено известным фактом более раннего начала половой жизни у женщин [601].

Распределение выявленных ВПЧ по типам представлено на Рисунке 36. Самые высокие ранговые значения по удельному весу занимают ВПЧ16 - 13,8% (13,0-14,5), ВПЧ6 - 10,6% (10,0-11,3), ВПЧ51 и ВПЧ44- 6,8% (6,3-7,3), ВПЧ53 - 6,3% (5,8-6,8), доля которых в общей структуре составляет - 44,3%. Наименьшее количество случаев выявлено для типов ВПЧ59 и ВПЧ35 - по 2,4% соответственно, ВПЧ82 – 2,1 %, ВПЧ11 - 1,2%, ВПЧ26 - 0,3%.



Над столбцами указана доля (%). Вертикальные отрезки в вершинах столбцов показывают границы 95% ДИ.

Рисунок 36 - Распределение выявленных ВПЧ по типам (n=8583)

Распределение выявленных типов ВПЧ по возрастным группам представлено в Таблице 36. Поскольку в возрастной группе детей от 0 до 14 лет было только 10 человек с положительным результатом на ДНК ВПЧ, в таблице она не представлена. В возрастных



группах 15-19, 20-29, 30-39, 40-49, 50-59 лет ведущими вариантами ВПЧ являются ВПЧ16 (удельный вес от 8,7 до 15,3%) и ВПЧ6 (от 9,3 до 16,4%). На основании имеющихся данных можно сделать вывод, что распределение доминирующих типов по возрастным группам в целом соответствует средним значениям, однако достоверные возрастные особенности также имеются. Так, в возрастной группе 60 и старше лет также превалирует ВПЧ16, доля которого составила 14,0% (6,9–21,0), но в отличие от других возрастных групп значительный удельный вес приходится и на ВПЧ44 -14,0% (6,9–21,0), что в 2 раза выше среднего значения в исследуемой популяции (6,8% (6,3–7,3),  $p=0,02$ ), тогда как доля ВПЧ6 составляет всего 1,1% (-1,0–3,2), что в 10 раз ниже среднего (10,6% (9,9–11,3),  $p=0,002$ ). В возрасте 50-59 лет ВПЧ56 входит в тройку ведущих вариантов ВПЧ этой возрастной группы и составляет 11,1% (7,2–15,0), что превышает в 2,4 раза средние значения ВПЧ56 (5,5% (5,0–6,0),  $p=0,0006$ ). В возрастных группах 50-59 лет и 60 лет и старше значительную долю составляет ВПЧ53 - 9,8% (6,1-13,5) и 10,7% (4,4-17,0) соответственно. В возрасте 15-19 и 20-29 лет ВПЧ51 занимает значительную долю - 8,7% (5,7–11,7) и 7,5% (6,7–8,3), соответственно, и входит в тройку ведущих вариантов ВПЧ. Природа таких возрастных отличий остается неясной.

Таблица 36 - Распределение типов ВПЧ по возрастным группам, %

Тип ВПЧ	15-19 лет (n=345)		20-29 лет (n=4346)		30-39 лет (n=2743)		40-49 лет (n=803)		50-59 лет (n=243)		старше 60 лет (n=93)	
	%	95% ДИ	%	95% ДИ	%	95% ДИ	%	95% ДИ	%	95% ДИ	%	95% ДИ
16	8,7	5,7-11,7	13,2	12,2-14,2	15,3	14,0-16,6	13,6	11,2-16,0	13,6	9,3-17,9	14,0	6,9-21,1
6	14,8	11,1-18,5	9,3	8,4-10,2	11,3	10,1-12,5	12,4	10,1-14,7	16,4	11,7-21,1	1,1	-1,0-3,2
51	8,7	5,7-11,7	7,5	6,7-8,3	5,5	4,6-6,4	7,0	5,2-8,8	5,0	2,3-7,7	5,4	0,8-0,0
44	4,6	2,4-6,8	5,9	5,2-6,6	7,4	6,4-8,4	9,5	7,5-11,5	6,2	3,2-9,2	14	6,9-21,1
53	5,0	2,7-7,3	5,6	4,9-6,3	6,7	5,8-7,6	7,2	5,4-9,0	9,8	6,1-13,5	10,7	4,4-17,0
31	5,2	2,9-7,5	6,1	5,4-6,8	5,5	4,6-6,4	5,2	3,7-6,7	4,1	1,6-6,6	2,2	-0,8-5,2
56	7,0	4,3-9,7	5,3	4,6-6,0	5,5	4,6-6,4	3,9	2,6-5,2	11,1	7,2-15,0	5,4	0,8-10,0
52	4,6	2,4-6,8	5,7	5,0-6,4	5,5	4,6-6,4	5,0	3,5-6,5	3,7	1,3-6,1	5,4	0,8-10,0
66	5,2	2,9-7,5	5,0	4,4-5,6	4,2	3,4-5,0	5,1	3,6-6,6	3,7	1,3-6,1	7,5	2,1-12,9
18	5,2	2,9-7,5	4,2	3,6-4,8	4,7	3,9-5,5	5,2	3,7-6,7	3,3	1,1-5,5	3,2	-0,4-6,8
33	3,5	1,6-5,4	4,3	3,7-4,9	4,9	4,1-5,7	4,1	2,7-5,5	2,9	0,8-5,0	3,2	-0,4-6,8
68	3,0	1,2-4,8	4,2	3,6-4,8	4,3	3,5-5,1	5,5	3,9-7,1	5,0	2,3-7,7	7,5	2,1-12,9
39	4,3	2,2-6,4	4,0	3,4-4,6	3,5	2,8-4,2	2,2	1,2-3,2	2,1	0,3-3,9	4,3	0,2-8,4
73	5,5	3,1-7,9	3,6	3,0-4,2	2,6	2,0-3,2	2,4	1,3-3,5	1,6	0,0-3,2	3,2	-0,4-6,8
45	1,7	0,3-3,1	2,9	2,4-3,4	3,4	2,7-4,1	2,9	1,7-4,1	5,0	2,3-7,7	2,2	-0,8-5,2
58	1,4	0,2-2,6	3,4	2,9-3,9	2,9	2,3-3,5	1,7	0,8-2,6	2,5	0,5-4,5	2,1	-0,8-5,0
59	4,3	2,2-6,4	2,8	2,3-3,3	1,9	1,4-2,4	1,6	0,7-2,5	0,4	-0,4-1,2	2,1	-0,8-5,0
35	2,3	0,7-3,9	2,6	2,1-3,1	2,1	1,6-2,6	2,6	1,5-3,7	1,2	-0,2-2,6	1,1	-1,0-3,2
82	4,1	2,0-6,2	2,3	1,9-2,7	1,7	1,2-2,2	1,7	0,8-2,6	1,6	0,0-3,2	3,2	-0,4-6,8
11	0,9	-0,1-1,9	1,7	1,3-2,1	0,9	0,5-1,3	0,6	0,1-1,1	0,8	-0,3-1,9	0,0	0,0-0,0
26	0,0	0,0-0,0	0,4	0,2-0,6	0,2	0,0-0,4	0,6	0,1-1,1	0,0	0,0-0,0	2,2	-0,8-5,2

Анализ находок ВПЧ среди мужского и женского населения показал, что ведущими типами, также как в целой когорте обследованных пациентов, являются: ВПЧ16, 6, 51, 44, 53 (Таблица 37). В то же время имеются и некоторые различия. Так, например, у мужчин наибольший удельный вес составляет вариант ВПЧ6, на долю которого приходится 17,4% (14,8–19,9),  $p < 0.002$  с учетом поправки Бонферрони, тогда как у женщин превалирует вариант ВПЧ16 - 14,1% (13,4–14,9),  $p < 0.002$ . Среди женской когорты меньший удельный вес находок ВПЧ53 - 6,1% (5,6–6,6) против 8,0% (6,1–9,9) среди мужчин,  $p = 0,02$ . Более чем в 2 раза у женщин выше процент находок таких вариантов как ВПЧ33 ( $p < 0.002$ ) и ВПЧ45 ( $p < 0.002$ ), в то время как удельный вес положительных находок ВПЧ11 ниже в 2,7 раза, чем у мужчин ( $p = 0,0008$ ). Интересно, что достоверно более частое выявление у мужчин ВПЧ-НР ВПЧ6 и ВПЧ11 в России в период с 2010 по 2016 гг. отмечено также в работе Донникова А.Е. с соавт. [600]. Выявленная тенденция более частого выявления у мужчин ВПЧ-НР (ВПЧ6 и ВПЧ11), и напротив, более частого выявления у ВПЧ-ВР (ВПЧ16, ВПЧ33, ВПЧ45) вероятно отражает клиническую значимость разных типов ВПЧ для мужчин и женщин.

Таблица 37 - Распределение типов ВПЧ по полу, %

Тип ВПЧ	Мужчины (n=825)		Женщины (n=7758)	
	%	95% ДИ	%	95% ДИ
16	10,4	8,3-12,5	14,1	13,4-14,9
6	17,3	14,8-19,9	9,9	9,2-10,6
51	6,8	5,1-8,5	6,8	6,2-7,4
44	6,9	5,2-8,6	6,7	6,2-7,3
53	8,0	6,1-9,9	6,1	5,6-6,6
31	4,5	3,1-5,9	5,8	5,3-6,3
56	5,7	4,1-7,3	5,5	4,9-6,0
52	5,0	3,5-6,5	5,5	5,0-6,0
66	5,8	4,2-7,4	4,6	4,1-5,1
18	3,4	2,2-4,6	4,6	4,1-5,0
33	2,2	1,2-3,2	4,6	4,1-5,1
68	3,9	2,6-5,2	4,4	4,0-4,9
39	2,9	1,8-4,1	3,7	3,3-4,1
73	2,9	1,8-4,1	3,2	2,8-3,6
45	1,3	0,6-2,1	3,2	2,8-3,6
58	2,8	1,7-3,9	3,0	2,6-3,4
59	3,4	2,2-4,6	2,3	2,0-2,7
35	1,9	1,0-2,9	2,4	2,1-2,8
82	1,3	0,6-2,1	2,2	1,9-2,5
11	2,9	1,8-4,1	1,1	0,8-1,3
26	0,6	0,1-1,1	0,3	0,2-0,4

Клинические образцы на исследование поступали из шести федеральных округов РФ, в которых проживает 94% населения страны, что позволило составить практически полную картину распространенности ВПЧ на территории РФ. Из общего количества выявленных случаев ВПЧ (n=8583), подавляющее большинство приходилось на Центральный федеральный округ (n=4902), второе место занимал Приволжский (n=1320), далее Южный – 737, Сибирский - 572, Северо-Кавказский - 537, Уральский - 365, Северо-Западный – 150 случаев. Распределение типов ВПЧ по разным федеральным округам в целом имело схожий характер – доминирующими типами были ВПЧ16, 6, 51, 44, 53 (Таблица 38). Наиболее значительные отклонения от средних значений отмечены в Северо-Западном ФО, где лидирующую позицию также занимал ВПЧ16 - 15,3% (9,6–21,1), тогда как на втором месте был ВПЧ52, доля которого составила 11,3% (6,3–16,4), что в 2,1 раза выше среднего (p=0,008). Долевое участие других типов также отличалось – ВПЧ68 был представлен в 3,4 раза меньше (1,3% (-0,5–3,2), p=0,09), тогда как ВПЧ33 – в 2 раза больше (8,7% (4,2–13,2), p=0,028) средних значений.

Ранее проведенные в России исследования по оценке распространенности ВПЧ разных типов как правило были ограничены одним регионом и/или малым количеством дифференцируемых типов ВПЧ (от 2 до 12 типов) [91]. Получение единой картины для всей страны по данным этих работ затруднительно, поскольку в них использованы разные тест-системы, отличающиеся как по количеству, так и по набору дифференцируемых ВПЧ типов. В настоящем исследовании проведено типирование 8583 ВПЧ, выявленных у 5013 пациентов с урогенитальной ВПЧ-инфекцией с помощью набора реагентов, предназначенного для дифференциального выявления 21 генотипа ВПЧ (18 типов ВПЧ-ВР и 3 типа ВПЧ-НР). Исследование охватывает взрослых мужчин и женщин всех возрастов, проживающих в разных регионах РФ. Установлено доминирование в 2019 году на территории РФ ВПЧ 16 типа (13,8%), тогда как наименьшую долю составили ВПЧ26 (0,4%), что согласуется с данными исследования Донникова А.Е. с соавт, полученными в период с 2010 по 2016 гг. [600]. Учитывая, что авторы этой работы провели свое исследование на большом количестве пациентов с ВПЧ-инфекцией (более 12000 человек) и использовали для генотипирования аналогичную тест-систему (HPV Квант-21, «ДНК-Технология»), такое сравнение можно считать корректным.

Таблица 38 - Распределение типов ВПЧ по федеральным округам РФ, %

Тип ВПЧ	Федеральный округ													
	Северо-Западный (n=150)		Северо-Кавказский (n=537)		Центральный (n=4902)		Сибирский (n=572)		Уральский (n=365)		Южный (n=737)		Приволжский n=(1320)	
	%	95% ДИ	%	95% ДИ	%	95% ДИ	%	95% ДИ	%	95% ДИ	%	95% ДИ	%	95% ДИ
16	15,3	9,6-21,1	16,2	13,1-19,3	14,1	13,1-15,1	14,7	11,8-17,6	15,1	11,4-18,7	10,6	8,4-12,8	12,0	10,3-13,8
6	8,7	4,2-13,2	14,2	11,2-17,1	10,1	9,2-10,9	10,3	7,8-12,8	10,1	7,0-13,2	12,2	9,8-14,6	11,3	9,6-13,0
51	6,0	2,2-9,8	8,0	5,7-10,3	6,1	5,4-6,8	6,6	4,6-8,7	7,7	4,9-10,4	7,7	5,8-9,7	8,3	6,8-9,8
44	4,0	0,9-7,1	4,8	3,0-6,7	7,2	6,5-8,0	7,9	5,7-10,1	5,2	2,9-7,5	6,9	5,1-8,8	5,8	4,6-7,1
53	4,0	0,9-7,1	5,4	3,5-7,3	6,3	5,6-7,0	7,7	5,5-9,9	5,2	2,9-7,5	6,6	4,8-8,4	6,1	4,8-7,3
31	4,7	1,3-8,0	5,0	3,2-6,9	5,8	5,1-6,4	6,1	4,2-8,1	6,0	3,6-8,5	4,9	3,3-6,4	5,7	4,4-6,9
56	3,3	0,5-6,2	5,4	3,5-7,3	5,5	4,8-6,1	4,0	2,4-5,6	7,1	4,5-9,8	5,0	3,4-6,6	6,2	4,9-7,5
52	11,3	6,3-16,4	5,6	3,6-7,5	5,5	4,9-6,1	4,9	3,1-6,7	3,0	1,3-4,8	5,8	4,1-7,5	5,2	4,0-6,3
66	3,3	0,5-6,2	4,8	3,0-6,7	4,8	4,2-5,4	4,0	2,4-5,6	4,7	2,5-6,8	6,2	4,5-8,0	4,2	3,1-5,2
18	6,7	2,7-10,7	2,6	1,3-4,0	4,8	4,2-5,4	4,0	2,4-5,6	4,7	2,5-6,8	4,1	2,6-5,5	3,9	2,9-5,0
33	8,7	4,2-13,2	5,0	3,2-6,9	4,4	3,8-5,0	4,9	3,1-6,7	4,1	2,1-6,1	4,1	2,6-5,5	3,6	2,6-4,6
68	1,3	-0,5-3,2	5,0	3,2-6,9	4,4	3,9-5,0	4,2	2,6-5,8	6,0	3,6-8,5	4,2	2,8-5,7	3,9	2,8-4,9
39	4,0	0,9-7,1	4,3	2,6-6,0	3,5	3,0-4,0	3,3	1,9-4,8	1,9	0,5-3,3	2,7	1,5-3,9	4,8	3,6-5,9
73	5,3	1,7-8,9	2,0	0,9-3,2	3,0	2,6-3,5	2,8	1,4-4,1	3,8	1,9-5,8	2,7	1,5-3,9	4,3	3,2-5,4
45	2,0	-0,2-4,2	2,8	1,4-4,2	2,9	2,4-3,4	2,8	1,4-4,1	4,1	2,1-6,1	2,8	1,6-4,1	3,6	2,6-4,6
58	4,7	1,3-8,0	2,8	1,4-4,2	3,1	2,6-3,5	2,3	1,1-3,5	2,7	1,1-4,4	3,3	2,0-4,5	2,7	1,8-3,6
59	2,0	-0,2-4,2	1,3	0,3-2,3	2,5	2,1-2,9	2,8	1,4-4,1	2,5	0,9-4,1	2,8	1,6-4,1	2,3	1,5-3,2
35	1,3	-0,5-3,2	1,7	0,6-2,8	2,4	1,9-2,8	2,3	1,1-3,5	2,7	1,1-4,4	2,4	1,3-3,6	2,6	1,7-3,4
82	2,0	-0,2-4,2	0,7	0,0-1,5	2,3	1,9-2,7	2,6	1,3-3,9	2,2	0,7-3,7	2,2	1,1-3,2	1,8	1,1-2,5
11	0,7	-0,6-2,0	1,3	0,3-2,3	1,0	0,7-1,3	1,6	0,6-2,6	0,5	-0,2-1,3	2,4	1,3-3,6	1,6	0,9-2,3
26	0,7	-0,6-2,0	0,9	0,1-1,7	0,4	0,2-0,5	0,2	-0,2-0,5	0,5	-0,2-1,3	0,1	-0,1-0,4	0,1	-0,1-0,2

ВПЧ-инфекция имеет наибольшее клиническое значение для женщин, у которых регистрируется 90% всех ВПЧ-ассоциированных онкологических заболеваний [95]. Полученные нами данные по распространенности типов ВПЧ-ВР у женщин, проживающих на территории РФ (n=7758), сопоставлены результатами обследования разных категорий женщин - с нормальной цитологией, плоскоклеточным интраэпителиальным поражением тяжелой степени (HSIL) и РШМ, проживающих в разных странах мира (Таблица 39). Распределение типов ВПЧ-ВР у разных категорий женщин значительно отличается, как по ранговому положению, так и по доле структуры, однако в первую десятку наиболее встречаемых типов у всех групп женщин входят 6 типов ВПЧ-ВР - 16, 18, 52, 51, 31, 33, суммарно отвечающие за 81,3% случаев РШМ в мире (подсчитано по данным Bosch F.X. с соавт. [602]).

Таблица 39 - Ранговое положение 10 наиболее распространенных типов ВПЧ ВР у разных категорий женщин

Ранговое положение	Женщины с нормальной цитологией *		Женщины с HSIL**		Женщины с РШМ ***		Женщины (настоящее исследование) ****	
	Тип ВПЧ	%	Тип ВПЧ	%	Тип ВПЧ	%	Тип ВПЧ	%
1.	16	2,6	16	45,4	16	54,4	16	14,1
2.	18	0,9	31	8,7	18	15,9	51	6,8
3.	58	0,9	33	7,3	33	4,3	53	6,1
4.	52	0,9	58	7,0	45	3,7	31	5,8
5.	51	0,6	18	6,9	31	3,5	56	5,5
6.	31	0,6	52	5,1	58	3,3	52	5,5
7.	56	0,5	35	3,8	52	2,5	66	4,6
8.	33	0,5	51	3,6	35	1,7	18	4,6
9.	45	0,4	56	2,9	59	1,0	33	4,6
10.	53	0,4	45	2,3	51	0,7	68	4,4
Всего	-	8,3	-	93,0	-	91,0	-	61,9

Представлены 10 наиболее часто встречаемых вариантов ВПЧ в порядке уменьшения частоты встречаемости.

\* Женщины, проживающие в 36 странах мира, n=157879 [602].

\*\* Женщины, проживающие в 38 странах мира, n= 7094 [602].

\*\*\* Женщины, проживающие в 56 странах мира, n=14595 [602].

\*\*\*\* Женщины с подтвержденной урогенитальной ВПЧ-инфекцией, РФ (n=7758).

В России еще не началась массовая вакцинопрофилактика ВПЧ-инфекции. В связи с этим, полученные результаты о распространенности ВПЧ разных типов на территории страны очень важны для прогнозирования эффективности вакцинопрофилактики заболеваний, вызванных ВПЧ-ВР и ВПЧ-НР. Из числа лицензированных вакцин наибольшее количество типов включает вакцина Гардасил 9 (Мерк Шарп и Доум Корп., США), в том числе ВПЧ6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 и 58 [603]. Если сопоставить долевое распределение типов, установленное в настоящем

исследовании (Рисунок 36), с составом вакцины Гардасил 9, то суммарно она «охватывает» 51,5% геновариантов ВПЧ, циркулирующих в России. Очевидно, что это число не отражает ожидаемой эффективности профилактики ВПЧ-инфекции этой вакциной, поскольку заражение разными типами ВПЧ сопряжено с различным риском развития РШМ. Так, известно, что только ВПЧ16 и ВПЧ18 суммарно отвечают более чем за 70% всех случаев инвазивного РШМ [95; 603; 604]. Поэтому, прогнозирование эффективности ВПЧ-вакцин различного состава следует проводить не только на основе распространенности разных типов ВПЧ, но и с учетом клинической значимости разных типов ВПЧ, циркулирующих в регионе. Несмотря на отмеченные ограничения, полученные результаты представляются важными для разработчиков ВПЧ-вакцин, поскольку позволяют формулировать их состав с учетом региональных особенностей распространенности разных типов ВПЧ.

*Материалы раздела 3.2.2 опубликованы [113].*

### **3.2.3 Исследование видового разнообразия сезонных коронавирусов человека, циркулировавших на территории московского региона в период с 2009 по 2014 гг.**

Задача исследования видового разнообразия коронавирусов, циркулирующих на территории московского региона, стояла перед нами в период с 2009 по 2014 года – задолго до начала пандемии COVID-19. На тот момент было известно шесть патогенных для человека видов коронавирусов, включая сезонные коронавирусы человека HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-NKU1, роль которых в патологии респираторного тракта была исследована нами в настоящем разделе. Задачи выявления высокопатогенных коронавирусов животного происхождения SARS-CoV-1 и MERS-CoV не ставилось. Все перечисленные вирусы относятся к отряду *Nidovirales*, подотряду *Cornidovirineae*, семейству *Coronaviridae*, подсемейству *Orthocoronavirinae*. К роду *Alphacoronavirus* относятся коронавирусы HCoV-229E (подрод *Duvinacovirus*, вид *Alphacoronavirus chicaoense*) и HCoV-NL63 (подрод *Setracovirus*, вид *Alphacoronavirus amsterdamense*). К роду *Betacoronavirus* относятся коронавирусы HCoV-NKU1 (подрод *Embecovirus*, вид *Betacoronavirus hongkongense*) и HCoV-OC43 (подрод *Embecovirus*, вид *Betacoronavirus gravedinis*).

Для выявления РНК коронавирусов человека в клинических образцах использован набор праймеров и зонда собственного дизайна: К-пр1, К-пр2, К-пр3, К-об1, К-об2, К-об3, К-от1, К-от2, К-от3, К-з1, К-з2 (Таблица 12) в составе ЭНР «ОРВИ-Монитор», предназначенный для выявления сезонных коронавирусов человека без установления видовой принадлежности. Для дифференциального выявления коронавирусов человека HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63

и HCoV-NKU1 были использованы видоспецифичные праймеры и зонды, рекомендованные Gaunt E.R. с соавт. [508].

Для изучения видового разнообразия коронавирусов из лабораторного музея клинических образцов были отобраны 29 образцов, в которых методом ОТ-ПЦР-РВ обнаружена РНК КВ, включая случаи смешанной инфекции. Методом ОТ-ПЦР-РВ с видоспецифичными праймерами в 3 образцах был идентифицирован HCoV-229E, в 9 – HCoV-NL63, в 7 – HCoV-NKU1, в 10 – HCoV-OC43. При этом не было получено спорных результатов, а все образцы были однозначно соотнесены с видом.

Далее была проведена клиническая оценка роли разных видов коронавирусов в этиологии ОРВИ различной степени тяжести. Показателем среднетяжелой и тяжелой формы заболевания служил факт госпитализации больного, тогда как на дому (амбулаторно) проходили лечение преимущественно пациенты с заболеванием, протекающим в легкой форме. Из общего числа образцов были исключены 4 случая смешанной инфекции КВ с другим респираторным вирусом, поскольку в таких случаях роль КВ в этиологии заболевания представляется менее определенной, чем в случаях моноинфекции. В случаях смешанной инфекции не представляется возможным определить, какой из выявленных вирусов вызвал первичную инфекцию и какой из них сыграл решающую роль в патогенезе заболевания. Таким образом, среди 29 случаев коронавирусной инфекции было выявлено 25 случаев моноинфекции, из которых в 13 случаях лечение проводилось в стационаре (52%) и в 12 случаях – в амбулаторных условиях (48%) (Таблица 40) [610].

Таблица 40 - Распределение случаев коронавирусной моноинфекции среди разных категорий пациентов

Коронавирус Категория пациентов	HCoV-229E	HCoV-NL63	HCoV-NKU1	HCoV-OC43	Всего
Лечение в стационаре	0	7*	0	6*	13
Амбулаторное лечение	3**	0	6**	3**	12
Всего	3	7	6	9	25

\* - дети в возрасте от 1 до 5 лет

\*\* - взрослые (пациенты старше 16 лет)

Установлено, что на территории московского региона в период с 2009 по 2014 гг. циркулировали представители всех четырех известных на момент проведения исследования видов сезонных коронавирусов человека – HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 и HCoV-NKU1. Все выявленные случаи коронавирусной моноинфекции, сопровождавшиеся госпитализацией пациента, были связаны с инфицированием детей в возрасте от 1 до 5 лет



HCOV-NL63 и HCOV-OC43. У всех пациентов, лечившихся амбулаторно (все старше 16 лет), были выявлены HCOV-HKU1, HCOV-OC43 и HCOV-229E. Важно отметить, что трое проходивших лечение на дому взрослых пациентов, у которых был выявлен HCOV-OC43, по данным анамнеза перенесли заболевание в среднетяжелой форме.

В РФ ранее проводились исследования, посвященные оценке роли сезонных коронавирусов в патологии человека. Так, в работе Мурадян А.Я. с соавт. (2003 г.) изучена роль коронавирусов в этиологии острых респираторных инфекций у детей в возрасте от 1 месяца до 14 лет, госпитализированных в базовые клиники НИИ гриппа РАМН (г. Санкт-Петербург) [605]. Авторы выявили высокую долю КВ-инфекции в общей структуре ОРВИ - из 4022 обследованных детей в 500 случаях (12,4%) выявлены маркеры коронавирусной инфекции, преимущественно в виде смешанной с другими респираторными вирусами инфекции (80%). Идентификацию коронавирусов авторы проводили в реакциях связывания комплемента, непрямой гемагглютинации и торможения гемагглютинации, используя парные сыворотки и носовые секреты больных. В качестве вирусного антигена использовали три вируса, выращенные в культуре клеток, - HCOV-229E и HCOV-OC43 (HCOV-NL63 и HCOV-HKU1 на тот момент еще не были открыты), а также штамм LP коронавируса с неустановленной видовой принадлежностью. В результатах исследования выявленные случаи КВ-инфекции указаны под общим названием – «коронавирусы», без деления на таксономические группы. Выявленная Мурадян А.Я. с соавт. чрезвычайно высокая доля случаев смешанной с коронавирусами инфекции (80%), на наш взгляд, не отражает реальной структуры возбудителей ОРВИ, а связана, возможно, с недостаточной специфичностью использованных методов исследования. При интерпретации полученных результатов важно также учитывать, что только два из четырех сезонных коронавирусов (HCOV-OC43 и HCOV-HKU1) имеют в составе вириона белок гемагглютинин-эстеразу (HE) [606], что позволяет для их детекции использовать методы, основанные на агглютинации эритроцитов, в том числе реакции непрямой гемагглютинации и торможения гемагглютинации.

Впоследствии Яцышина С.Б. с соавт. (2020 г.), используя разработанный во ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора набор реагентов «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL», показала циркуляцию в РФ коронавирусов человека - представителей родов *Alphacoronavirus* и *Betacoronavirus*, но без установления видовой принадлежности [607].

Анализ научной литературы показывает, что различия в вирулентности и тканевой специфичности могут определяться видом коронавируса. Так, HCOV-NL63 чаще, чем другие виды КВ, приводил к развитию крупы у детей [608]. Gaunt E.R. с соавт. показали, что среди пациентов как с моноинфекцией HCOV-NL63 и HCOV-OC43, так и в случаях коинфекции с другим респираторным вирусом, значительно преобладали случаи, сопровождавшиеся

поражением нижних отделов дыхательных путей [508]. В исследовании Jevšnik M. с соавт. показано, что более 70% случаев коронавирусной инфекции (как моно- так и смешанной) у детей сопряжено с поражением нижних отделов дыхательных путей, что приводило к госпитализации [609]. Полученные в нашей работе результаты согласуются с приведенными выше данными. Однако, небольшой размер выборки не позволяет нам делать серьезных выводов о различиях в вирулентности у разных видов коронавирусов.

Таким образом, данные, полученные с применением двухэтапной идентификации коронавирусов высокоспецифичным методом ОТ-ПЦР-РВ, позволяют нам сделать обоснованный вывод о циркуляции на территории РФ всех четырех видов сезонных коронавирусов, включая HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 и HCoV-NKU1. При этом, у всех детей с инфекцией HCoV-OC43 и HCoV-NL63 заболевание протекало в среднетяжелой и тяжелой форме, вследствие чего они проходили лечение в стационаре. Полученные результаты обладают научной новизной и подтверждают тезис об убикивитарности сезонных коронавирусов человека.

*Материалы раздела 3.2.3 опубликованы [610–612].*

### **3.3 РАЗРАБОТКА НАУЧНЫХ ОСНОВ СОЗДАНИЯ ЖИВЫХ АТТЕНУИРОВАННЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ КРАСНУХИ И COVID-19**

#### **3.3.1 Выявление фенотипических и генетических маркеров аттенуации вируса краснухи**

Краснуха – острое вирусное заболевание, вызванное вирусом краснухи (вид *Rubivirus rubella*), который относится к семейству *Matonaviridae* отряда *Hepelivirales*). Вакцинация является наиболее эффективным, экономичным и доступным средством борьбы с краснухой. До начала массовой вакцинопрофилактики краснуху относили к детским вирусным инфекциям, но в настоящее время заболевание встречается как у детей, так и у взрослых. В России вакцинация против краснухи введена в НКИ с 1998 г., а для иммунизации населения применяется вакцина, разработанная Plotkin S.A. на основе штамма Wistar RA27/3 и впервые зарегистрированная в Европе в 1971 г. [426]. Для снижения издержек на закупку зарубежной вакцины требуется создание отечественной вакцины против краснухи.

Ранее в НИИ вирусных препаратов им. О.Г. Анджaparидзе (ныне: отдел вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова) под руководством д.м.н. Десятковой Р.Г. был получен холодоадаптированный аттенуированный штамм вируса краснухи С-77 [496]. Штамм С-77 был выделен и пассирован в культуре клеток Vero - всего проведено 34 пассажа при температуре 35°C и 14 пассажей при 33°C. В процессе адаптации к культуре клеток Vero штамм приобрел свойство вызывать выраженную дегенерацию клеток RK-13, проявляя по этому признаку сходство с вакцинным штаммом Wistar RA27/3. Указанный признак является проявлением адаптации вируса к новому хозяину и может быть дополнительным свидетельством его

аттенуации. Получено и другое экспериментальное доказательство аттенуации штамма С-77 – более низкая по сравнению с родительским штаммом иммуногенность для мышей (так называемый «иммунологический маркер аттенуации»). Полученный *ca/att* штамм проявлял гемагглютинирующую активность и характеризовался стабильной репродукцией, достигая в культуре клеток Vero титров  $10^5$ – $10^6$  БОЕ/мл. Методом ТЭМ в препаратах штамма С-77 выявлены типичные для вируса краснухи вирионы [496]. Получение *ca* мутанта штамма С-77 вируса краснухи позволило исследовать его потенциал в качестве кандидатного вакцинного штамма.

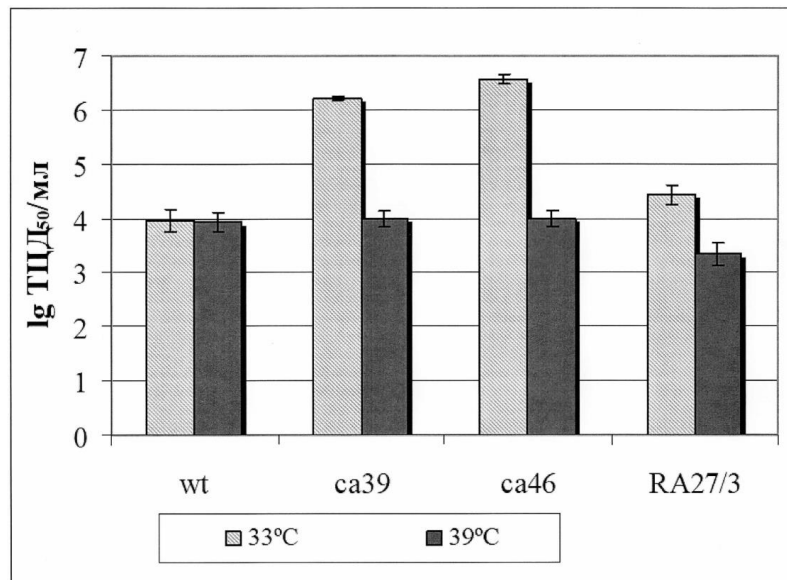
Среди показателей, определяющих подлинность и безопасность вакцинного штамма, особое значение имеет стабильность его генотипа и фенотипа. Контроль стабильности этих показателей процессе производства и клинического применения живых вакцин необходим, поскольку при пассировании вируса в культуре клеток, или передачи вакцинного штамма от привитого человека к непривитому, возможно накопление в его геноме мутаций, способных привести к реверсии вирулентности, или к снижению иммуногенных свойств. Важно отметить, что контроль генетической стабильности, поиск генетических маркеров аттенуации и подтверждение их наличия в вакцинных штаммах ЖАВ регламентируется ВОЗ [WHO, Technical Report Series No 941, 2007; WHO Technical Report, Series №. 924 2004]. Однако, механизмы аттенуации вакцинных штаммов вируса краснухи остаются малоизученными. Например, генетические маркеры аттенуации широко применяемого во всем мире вакцинного штамма Wistar RA27/3 не установлены в связи с отсутствием родительского штамма, необходимого для проведения сравнительного анализа геномов дикого и вакцинного штаммов. В связи с этим, нам представилось целесообразным провести поиск ключевых мутаций, ведущих к аттенуации *ca* мутанта штамма С-77, а также выявление фенотипических маркеров аттенуации. Для достижения этой цели требовалось дать полногеномную характеристику дикому (*wt*) штамма С-77 и его *ca* мутанту.

#### ***Выявление фенотипических маркеров аттенуации вируса краснухи***

В процессе адаптации к клеткам нового хозяина в условиях пониженной температуры вирус краснухи приобретает ряд фенотипических отличий от диких штаммов, определяющих его аттенуацию. Маркерами аттенуации вируса является наличие у него *ca* и *ts* фенотипа, т.е. способности эффективно репродуцироваться при пониженной температуре, что сопровождается сниженной репродуктивной активности при температурах 37°C–39°C и выше. Аттенуацию всех вакцинных штаммов вируса краснухи проводили при пониженной температуре, в результате чего они приобрели *ca* фенотип [613]. Мы оценили интенсивность репродукции *wt* и *ca* вариантов штамма С-77 при различных температурах культивирования, включая 33°C и 39°C, используя в качестве референсного вакцинный штамм Wistar RA27/3. Для этого культуру клеток Vero заражали вирусом краснухи при МОИ 0,01 ТЦД<sub>50</sub> на клетку,

собирали образцы вирусосодержащей жидкости на 3-6 сутки п.и. и исследовали методом количественной ОТ-ПЦР-РВ [24].

Было установлено, что на пятый день культивирования при 39°C титр са46, са39 вариантов штамма С-77 и штамма Wistar RA27/3 был меньше на 2,6, 2,2 и 1,1 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл соответственно, чем при температуре культивирования 33°C ( $p < 0,01$ , U-критерий Манна-Уитни), при этом дикий (*wt*) штамм С-77 размножался при температурах 33°C и 39°C с одинаковой эффективностью (Рисунок 37). Разница в титре варианта са46 при разных температурах культивирования была более выражена, чем у варианта са39 ( $p < 0,01$ , U-критерий Манна-Уитни), что может быть обусловлено более длительной (на 7 пассажей больше) адаптацией варианта са46 к пониженной температуре культивирования. Полученные результаты подтвердили наличие у вариантов са46 и са39 *sa* фенотипа [24, 618].

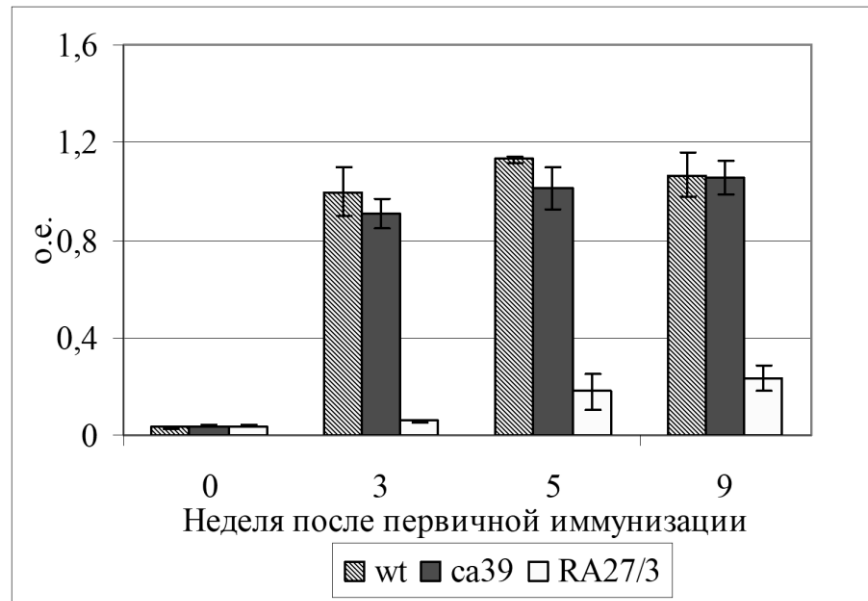


Данные получены методом количественной ОТ-ПЦР-РВ и представлены в виде средних значений трех независимых экспериментов. Отрезки - SEM.

Рисунок 37 - Накопление *wt*, *sa39*, *sa46* вариантов штамма С-77 и штамма Wistar RA27/3 вируса краснухи в культуральной жидкости на 5-й день культивирования при температурах 33°C и 39°C

Одним из фенотипических маркеров аттенуации, присущих вакцинным штаммам вируса краснухи, является пониженная иммуногенность для кроликов по сравнению с диким штаммом [614]. Наличие у *sa* мутантов штамма С-77 иммунологического маркера аттенуации, описанное Десятковой Р.Г. [496], подтверждали в эксперименте по внутривенной иммунизации кроликов *wt*, *sa39* вариантами штамма С-77 с использованием в качестве препарата сравнения вакцинного штамма Wistar RA27/3. В ответ на введение вариантов *sa39* и *wt* уже на 3-й неделе у всех животных проявилась сероконверсия вирусоспецифических IgG-антител (Рисунок 38). Наибольшей иммуногенностью обладали *sa39* и *wt* варианты штамма С-77, тогда как в ответ на введение штамма Wistar RA27/3 сероконверсия была менее выраженной и сопровождалась

меньшими титрами антител к вирусу. Однако выявленная разница в иммуногенности *ca39* и *wt* не была выраженной [24].



Титр вируса для иммунизации, – 3,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, разведение сывороток 1:100. Отрезки - SEM.

Рисунок 38 - Уровень IgG антител при первичной иммунизации кроликов *wt*, *ca39* вариантами штамма С-77 и штаммом RA27/3, установленный методом ИФА

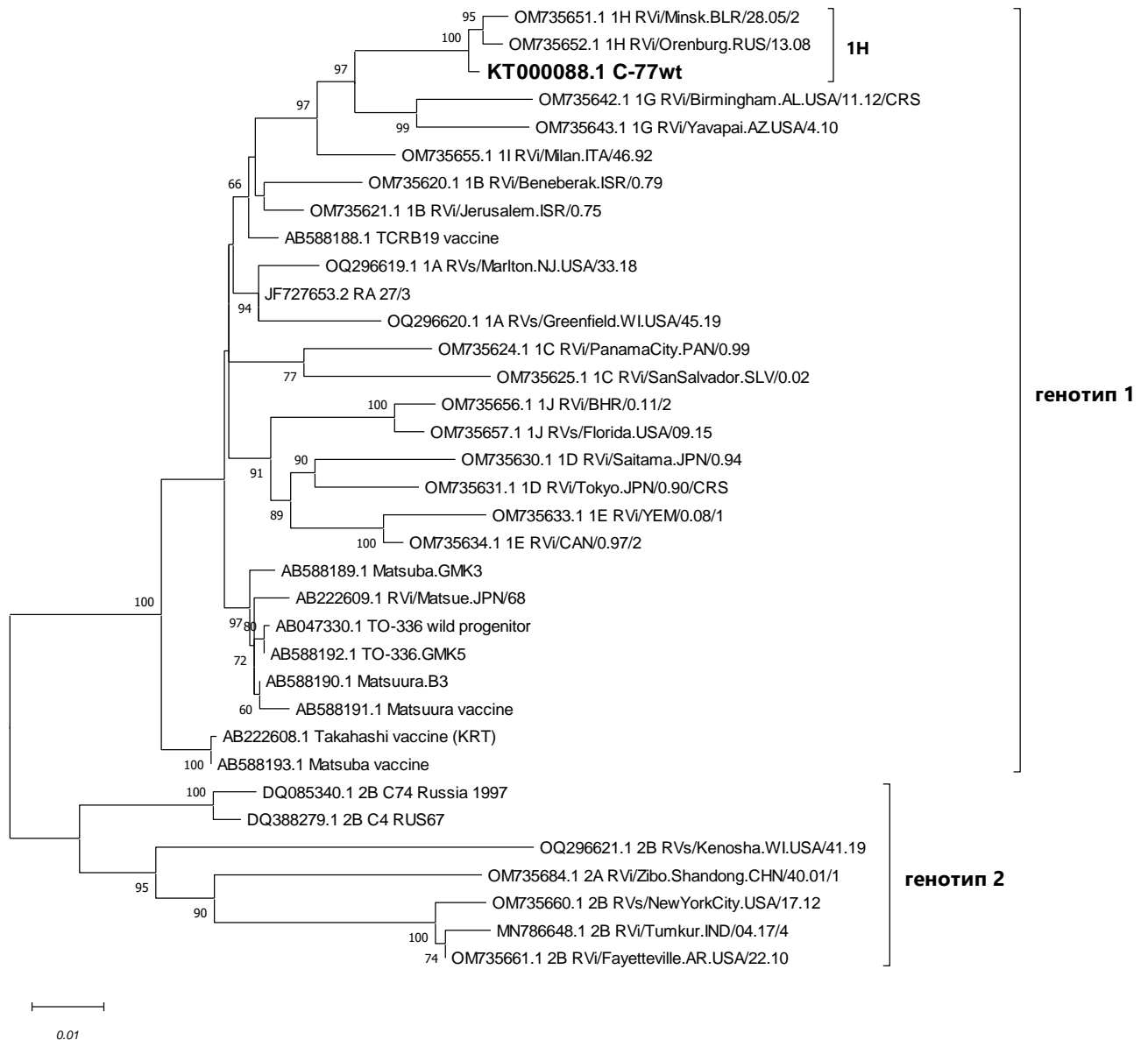
Более информативным при выявлении различий в иммуногенности оказалось определение титра ВНА. В этих же сыворотках уже на первой неделе п.и. наблюдалось появление вируснейтрализующих антител (ВНА) к *wt* варианту штамма С-77, титр которых достигал максимальных значений к третьей неделе п.и. При этом титр ВНА к варианту *ca39* штамма С-77, а также к штамму RA27/3 был ниже предела чувствительности метода ( $\leq 8$ ), что согласуется с классическим испытанием Linnemann С. с соавт. [614] на иммуногенность аттенуированных штаммов [24].

Полученные данные свидетельствуют о большей иммуногенности для кроликов дикого штамма С-77 по сравнению с его *ca* потомком. Иммунологический маркер аттенуации может быть использован наряду с оценкой *ca* фенотипа *in vitro* для дифференцирования дикого и аттенуированного вариантов вируса краснухи и контроля стабильности фенотипа вакцинного штамма [24].

***Сравнительный анализ геномных последовательностей аттенуированного мутанта штамма С-77 с известными последовательностями вируса краснухи***

С целью выявления вероятных генетических детерминант аттенуации было проведено полное секвенирование генома *wt* и *ca39* вариантов штамма С-77 вируса краснухи. В результате были определены все последовательности, кодирующие вирусные белки (GenBank ID

KT000088 и KT000089). Несмотря на существование только одного серотипа вируса краснухи и высокую консервативность генома, генотипирование клинических изолятов штаммов вируса краснухи является важной задачей эпидемиологического мониторинга. С целью генотипирования было проведено выравнивание нуклеотидных последовательностей гена E1 штамма C-77 (1442 нт, координаты 8256-9698) и штаммов вируса краснухи с известным генотипом, что позволило отнести штамм C-77 к генотипу 1h (Рисунок 39).



Древо построено методом максимального правдоподобия, используя двухпараметрическую эволюционную модель Kimura. Надежность формирования узлов древа оценивали методом «бутстрэп»-анализа и выражали как процент от 500 альтернативных древ, поддерживающих данную группу. Для обозначения штаммов использовался номер GenBank, генотип, названия штаммов.

Рисунок 39 - Дендрограмма, построенная на основе сравнения нуклеотидных последовательностей, кодирующих ген E1 вируса краснухи штамма C-77 и штаммов вируса с известным генотипом

Параллельно, в качестве контроля качества секвенирования, определили последовательность гена E1 вакцинного штамма RA27/3. Полученная нами последовательность на 100% совпала с уже известной (GenBank ID FJ211588).

В результате проведенного сравнительного анализа у варианта са39 обнаружено 13 нуклеотидных замен, 6 из которых приводили к замене аминокислоты. Во фрагменте, кодирующем открытую рамку считывания неструктурных белков (ORF NSP), было обнаружено 8 нуклеотидных замен, 4 из которых ведут к замене аминокислоты. Во фрагменте, кодирующем открытую рамку считывания структурных белков (ORF SP), было обнаружено 5 нуклеотидных замен, 2 из которых ведут к замене аминокислоты (Таблица 41) [618].

Таблица 41 - Мутации, выявленные у варианта са39 штамма С-77 [618]

Участок генома		Нуклеотидные замены			Аминокислотные замены				
		Позиция	wt	са39	Уникальность**	Позиция	wt	са39	
ORF NSP	P150	164	ACC	TCC	Нет	21	Thr	Ser	
		328	AGC	AGT*	Да	-	-	-	
		2320	AGC	AGT*	Нет	-	-	-	
		3165	TAC	TGC	Да ***	<b>1042</b>	<b>Tyr</b>	<b>Cys</b>	
		3357	AGT	ACT	Да	<b>1106</b>	<b>Ser</b>	<b>Thr</b>	
	P90		5360	CTC	TTC	Нет	1774	Leu	Phe
			6064	TTC	TTT*	Да***	-	-	-
			6223	GTC	GTT*	Нет	-	-	-
ORF SP	C	6588	CTC	TTC	Да	<b>27</b>	<b>Leu</b>	<b>Phe</b>	
		7392	GCC	GCT*	Нет	-	-	-	
	E2	7490	CAT	CAC*	Нет	-	-	-	
		8199	GCC	ACC	Да	<b>564</b>	<b>Ala</b>	<b>Thr</b>	
	E1	8957	GTC	GTT*	Нет	-	-	-	

\* Синонимичная замена. \*\* Уникальность мутации определялась путем сравнения с известными последовательностями диких штаммов вирусов краснухи, представленными в базе данных GenBank. \*\*\* Обнаружено совпадение только с одной последовательностью дикого штамма из базы данных GenBank. Жирным шрифтом выделены уникальные аминокислотные замены.

Далее было проведено множественное выравнивание последовательностей са39 и wt вариантов штамма С-77 с последовательностями 97 диких штаммов вируса краснухи из базы данных GenBank (NCBI), включая 24 полноразмерных генома, 44 последовательности ORF SP, 2 последовательности ORF NSP, 29 последовательностей, кодирующих протеазу. Проведенное сравнение позволило обнаружить 4 аминокислотные замены, которые являются уникальными, то есть не встречаются у диких штаммов вируса краснухи (Таблица 41). Две уникальные замены локализируются в позициях 3165 и 3357 ORF NSP, что соответствует аминокислотным заменам Tyr1042Cys и Ser1106Thr в протеазе. В позициях 6588 и 8199 ORF SP локализируются две других замены, приводящие к заменам Leu27Phe в белке С и Ala567Thr в белке E2.

В поиске общих закономерностей генетических изменений, возникающих в геноме вируса краснухи при холодовой адаптации, проведен сравнительный анализ аминокислотных замен вариант *sa39* штамма *C-77* с соответствующими позициями геномов вакцинных штаммов вируса краснухи и их родительских штаммов (при наличии) (Таблица 42). Перечисленные вакцинные штаммы относятся к генотипу 1a, за исключением китайских штаммов BRD-1 и BRD-2, которые относятся к генотипу 2A [618].

Замены Thr21Ser (ORF NSP, метилтрансфераза) и Leu1774Phe (ORF NSP, РНК-зависимая РНК-полимераза) *sa* варианта штамма *C-77* не являются уникальными, что не позволяет судить о значимости этих замен в детерминации аттенуационного фенотипа этого штамма. Однако, примечательно, что в позиции 21 ORF NSP вакцинного штамма Wistar RA27/3 также, как и у *sa39* варианта *C-77* находится аминокислота серин, однако отсутствие дикого штамма-предка у RA27/3 затрудняет оценку роли этой аминокислоты [618].

Выявленные у *sa* варианта штамма *C-77* аминокислотные замены Tyr1042Cys и Ser1106Thr в протеазном домене ORF NSP и Leu27Phe и Ala564Thr в доменах С-белка и E2-белка ORF SP являются уникальными - у диких штаммов вируса краснухи (за редким исключением) не обнаруживалось такой же аминокислоты в данной позиции. Уникальность этих замен может отражать их важную роль в адаптации к новому хозяину или приобретении *ca/att* фенотипа [618].

Мутации Ser1106Thr в ORF NSP и Leu27Phe и Ala564Thr в ORF SP не встречались у других вакцинных штаммов. Замена Tyr1042Cys в протеазном домене ORF NSP также не встречалась у других вакцинных штаммов, однако в этой же позиции у штаммов Matsuba и Takahashi vaccine имеется замена Tyr1042His. Более того, у двух вакцинных штаммов TCRB-19 и Cendehill, для которых не сохранились родительские штаммы, эту позицию занимают аминокислоты Cys и His соответственно. Мы дополнительно провели секвенирование фрагмента генома, кодирующего протеазу (1364 нт), варианта *sa46* штамма *C-77*, которое показало сохранение мутации Tyr1042Cys. Следовательно, замена Tyr1042Cys в протеазном домене штамма *C-77* заслуживает особого внимания [618].



Таблица 42 - Сравнение аминокислотных замен *са* варианта штамма С-77, приобретенных в процессе холодовой адаптации, с известными вакцинными штаммами вируса краснухи и их дикими штаммами-предками [618]

Штамм (генотип)	ORF NSP								ORF SP			
	Метилтрансфераза		Протеаза				RdRp		С		Е2	
	164	21	3165	1042	3357	1106	5360	1774	6588	27	8199	564
С-77 wt (1h)	ACC	Thr	TAC	Tyr	AGT	Ser	CTC	Leu	CTC	Leu	GCC	Ala
С-77 ca39 (1h)	TCC	Ser	TGC	Cys*	ACT	Thr*	TTC	Phe	TTC	Phe*	ACC	Thr*
С-77 ca46 (1h)	н/с	н/с	TGC	Cys*	н/с	н/с	н/с	н/с	н/с	н/с	н/с	н/с
Matsuba wt (1A)	ACC	Thr	TAC	Tyr	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
Matsuba vac (1A)	ACC	Thr	CAC	His	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
BRD-1 wt (2A)	ACC	Thr	TAC	Tyr	AGC	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
BRD-2 vac (2A)	ACC	Thr	TAC	Tyr	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
KRT wt (1A)	ACC	Thr	TAT	Tyr	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
KRT vac (1A)	ACC	Thr	CAC	His	AGT	Ser	TTT	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
TO-336 wt (1A)	ACC	Thr	TAC	Tyr	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
TO-336 vac (1A)	ACC	Thr	TAC	Tyr	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
Matsuba wt (1A)	ACC	Thr	TAC	Tyr	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
Matsuura vac (1A)	ACC	Thr	TAC	Tyr	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
TCRB-19 vac (1A)	ACC	Thr	TGC	Cys	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
Cendehill vac (1A)	ACC	Thr	CAC	His	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala
RA27/3 vac (1A)	TCC	Ser	TAC	Tyr	AGT	Ser	TTC	Phe	CTC	Leu	GCC	Ala

На белом фоне – аттенуированные/вакцинные штаммы вируса краснухи, серым цветом выделены соответствующие родительские штаммы. н/с - секвенирование не проводилось. RdRp – РНК-зависимая РНК-полимераза. \* - уникальная аминокислотная замена (не встречается у диких штаммов). GenBank ID последовательностей, использованных в сравнительном анализе: С-77wt - KT000088, С-77ca - KT000089, Matsuba vaccine - AB588193, Matsuba GMK3 - AB588189, BRD-2 Vac - AY258323, BRD-1 - AY258322, Takahashi vaccine (KRT) AB222608, RVi/Matsue.JPN/68 AB222609, Matsuura.B3 - AB588190, Matsuura vaccine - AB588191, TO-336 vaccine - AB047329, TO-336 wild progenitor - AB047330.1, TCRB19 vaccine - AB588188, Cendehill - AF188704, Wistar RA27/3 - FJ211588.

Ряд научных групп сходится в том, что мутации в вакцинных штаммах вируса краснухи, локализованные в ORF NSP, отвечают за появление *ca* и *ts* фенотипа [405; 407–409]. В нашем исследовании было выявлено 4 несинонимичные замены в области, кодирующей неструктурные белки, 2 из них в области, кодирующей протеазу. В протеазном домене локализуется ряд мутаций, выявленных двумя группами японских вирусологов, ответственных за снижение репродукции вируса при повышенной температуре [407; 408]. В вакцинном штамме TCRB-19 в позиции 1042 протеазного домена находится аминокислота Cys, а в штаммах Matsuba и Cendehill – Tyr и His соответственно. Методами обратной генетики доказано, что замена Tyr1042His у вакцинного штамма Takahashi vaccine сопровождалась появлением *ts* фенотипа [407]. При обратной замене (His1042Tyr) наблюдался значительный рост интенсивности репродукции штамма Takahashi vaccine при 39°C, однако, при замене Tyr1042His в геноме родительского штамма RVi/Matsue.JPN/68 наблюдалось лишь незначительное снижение репродукции вируса при 39°C, что свидетельствует о наличии дополнительных детерминант температурной чувствительности [408]. Приведенные выше данные позволяют с высокой степенью уверенности утверждать, что замена Tyr на Cys в позиции 1042 в протеазном домене штамма С-77 является не случайной, а напрямую связана с приобретенным *ca* фенотипом.

Обнаруженные нами замены в протеазном домене *ca* варианта штамма С-77, а также другими научными группами у вакцинных штаммов Takahashi KRT и ТО-336 vaccine, возможно определяют снижение активности вирусной протеазы при повышенной температуре культивирования, что в результате может негативно отражаться на уровне репродукции вируса [408]. В синтезе геномной РНК участвуют продукты процессинга полипротеина р200 – белки р150 и р90, поэтому эффективная репликация вирусного генома не может происходить без процессинга НСБ, осуществляемого вирусной протеазой [410]. Кроме того, протеазный домен вируса краснухи содержит участок связывания ионов Ca<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup> (основания 1152–1183), богатый цистеином, важный для проявления протеазной активности и репродукции вируса [409]. Данный участок находится в непосредственной близости к позициям уникальных замен в протеазном домене С-77 и включает домен связывания кальмодулина (кальций-связывающий белок), который также играет важную роль в проявлении протеазной активности и репродукции вируса [411]. Мутации в этом домене приводят к снижению его конформационной стабильности при высокой температуре, что является возможной причиной приобретения *ts* фенотипа рядом вакцинных штаммов вируса краснухи [615].

Важно отметить, что у других представителей семейства *Togaviridae* (к которому вирус краснухи относили до 2018 г.), таких как вирус Синдбис и вирус леса Семлики, выявлены штаммы с *ts* фенотипом, имеющие одиночные мутации в доменах протеазы и хеликазы [616].

Однако, нельзя исключать вклад в развитие *sa* фенотипа мутантов штамма С-77 и других мутаций, в том числе синонимичных замен.

Проведенное исследование подтвердило наличие у мутантов штамма С-77 вируса краснухи (39 и 46 пассаж) *sa* фенотипа. Атенуационный фенотип *sa* варианта штамма С-77 проявляется в снижении иммуногенности для кроликов и репродуктивной активности в культуре клеток Vero при температуре 39°C по сравнению с культивированием при температуре 33°C. В геноме варианта *sa39* штамма С-77 выявлено 13 нуклеотидных замен, из которых 6 кодируют аминокислотные замены, 4 из которых являются уникальными. Выявленные мутации, в первую очередь уникальные аминокислотные замены, играют важную роль в адаптации вируса к новому хозяину и/или в приобретении *sa* и *att* фенотипа. При этом аминокислотная замена Tyr1042Cys в области, кодирующей протеазу ORF NSP, вероятно играет ключевую роль в приобретении *ts* фенотипа *sa* мутантом штамма С-77. Мутант *sa39* штамма С-77 по своим биологическим свойствам может рассматриваться в качестве кандидата для разработки на его основе отечественной живой аттенуированной вакцины против краснухи.

*Материалы раздела 3.3.1 опубликованы [406; 617; 618].*

### **3.3.2 Получение и характеристика холодаадаптированных мутантов коронавируса SARS-CoV-2**

Более чем полувековой успешный опыт применения вирусных ЖАВ показал их способность обеспечить формирование стойкого клеточного и гуморального иммунного ответа и перекрестную защиту в отношении различных антигенных вариантов вируса. Применение живых вирусных вакцин обосновано не только их высокой иммунологической эффективностью, но и экономической целесообразностью, поскольку они отличаются более низкой себестоимостью производства. Однако, по данным ВОЗ на 30.03.2023 года, из 183 лицензированных и проходящих клинические испытания вакцин против COVID-19 только две вакцины (~1%) созданы на основе живых аттенуированных штаммов, полученных путем деоптимизации кодонов: COVI-VAC (Codagenix/Serum Institute of India, Индия) и MV-014-212 (Meissa Vaccines, Inc., США) (Таблица 43). В связи с вышеизложенным, разработка ЖАВ против COVID-19, потенциально обладающей перекрестной протективной активностью в отношении разных антигенных вариантов вируса, является актуальной задачей здравоохранения.

В многочисленных исследованиях показано, что адаптация вирусов к росту при пониженной субоптимальной температуре приводит к появлению *sa* и *ts* фенотипа, который ассоциирован со снижением вирулентности [13], при этом полученный аттенуированный мутант при иммунизации обеспечивает эффективную защиту от заражения вирусом дикого

типа. Получение *ts* мутантов вирусов является одним из традиционных подходов к разработке ЖАВ [13; 14]. Ранее научные группы из Японии, Южной Кореи и Ирана сообщили о получении аттенуированных *sa* штаммов SARS-CoV-2, обладающих *ts* фенотипом [84; 417; 419]. В нашем исследовании также получены *sa* мутанты SARS-CoV-2 и на животной модели коронавирусной пневмонии (золотистые сирийские хомячки) исследована их вирулентность, иммуногенность и протективная активность.

Таблица 43 - Вакцины, находящиеся на разных стадиях клинических испытаний [619]

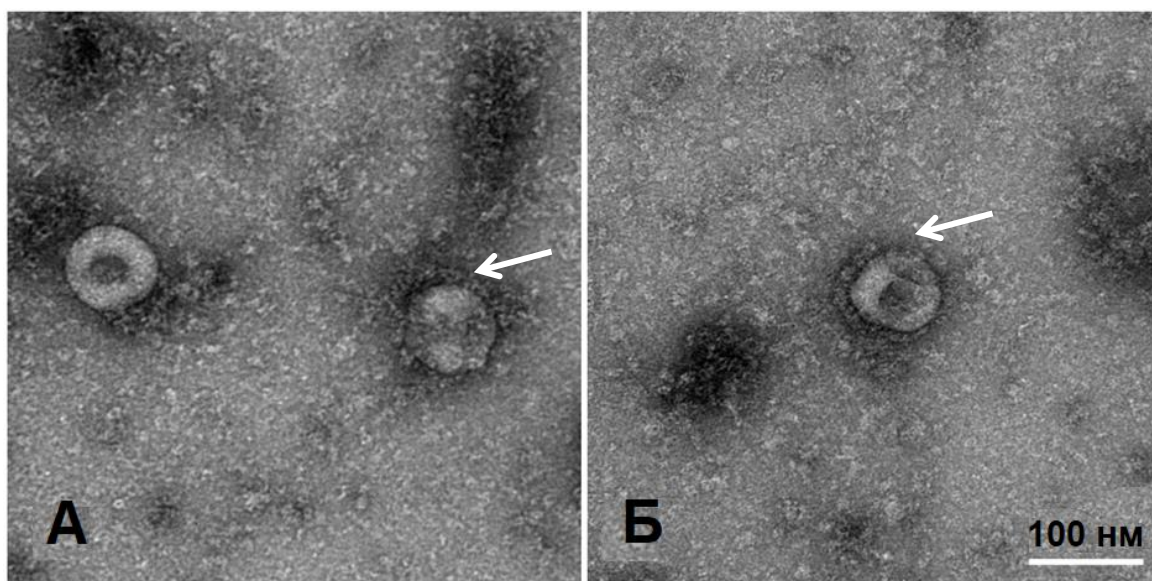
Технологическая платформа	Количество вакцин (данные ВОЗ на 30.03.2023 г.)
Субъединичные	59
РНК-вакцины	43
Вирусные векторы (нереплицирующиеся)	25
Инактивированные	22
ДНК-вакцины	17
Вирусоподобные частицы	7
Вирусные векторы (реплицирующиеся)	4
Другие	4
<b>Живые аттенуированные</b>	<b>2</b>
Всего	183

### ***Изоляция SARS-CoV-2 в культуре клеток***

Поскольку на момент начала исследования в коллекциях вирусов лабораторные штаммы нового коронавируса были недоступны, штаммы SARS-CoV-2, относящиеся к различным VOCs-вариантам, были получены самостоятельно путем изоляции в культуре клеток почки африканской зеленой мартышки Vero CCL-81 от пациентов с лабораторно-подтвержденным COVID-19. С этой целью использовали мазки из ротоглотки, в которых методом ОТ-ПЦР-РВ выявлено высокое содержание РНК SARS-CoV-2 ( $C_t \leq 25$ ). Клиническим материалом заражали культуру клеток Vero CCL-81 и инкубировали в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 5-7 суток до появления признаков ЦПД, проявляющегося в округлении клеток, после чего проводили следующий пассаж. С целью идентификации вируса, материал анализировали на наличие РНК SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР-РВ с праймерами к N-гену. Кроме того, методом клеточного ИФА установлено, что нативный вирусный антиген, полученный в зараженных клетках, реагировал в ИФА с сыворотками реконвалесцентов COVID-19 и не реагировал с сыворотками не болевших людей.

В препаратах Wuhan-подобного изолята Dubrovka методом ТЭМ были выявлены вирусные частицы с морфодиагностическими признаками коронавируса: вирионы имели

округлую форму и диаметр 90-110 нм с характерными шипами 12-15 нм на оболочке (Рисунок 40).



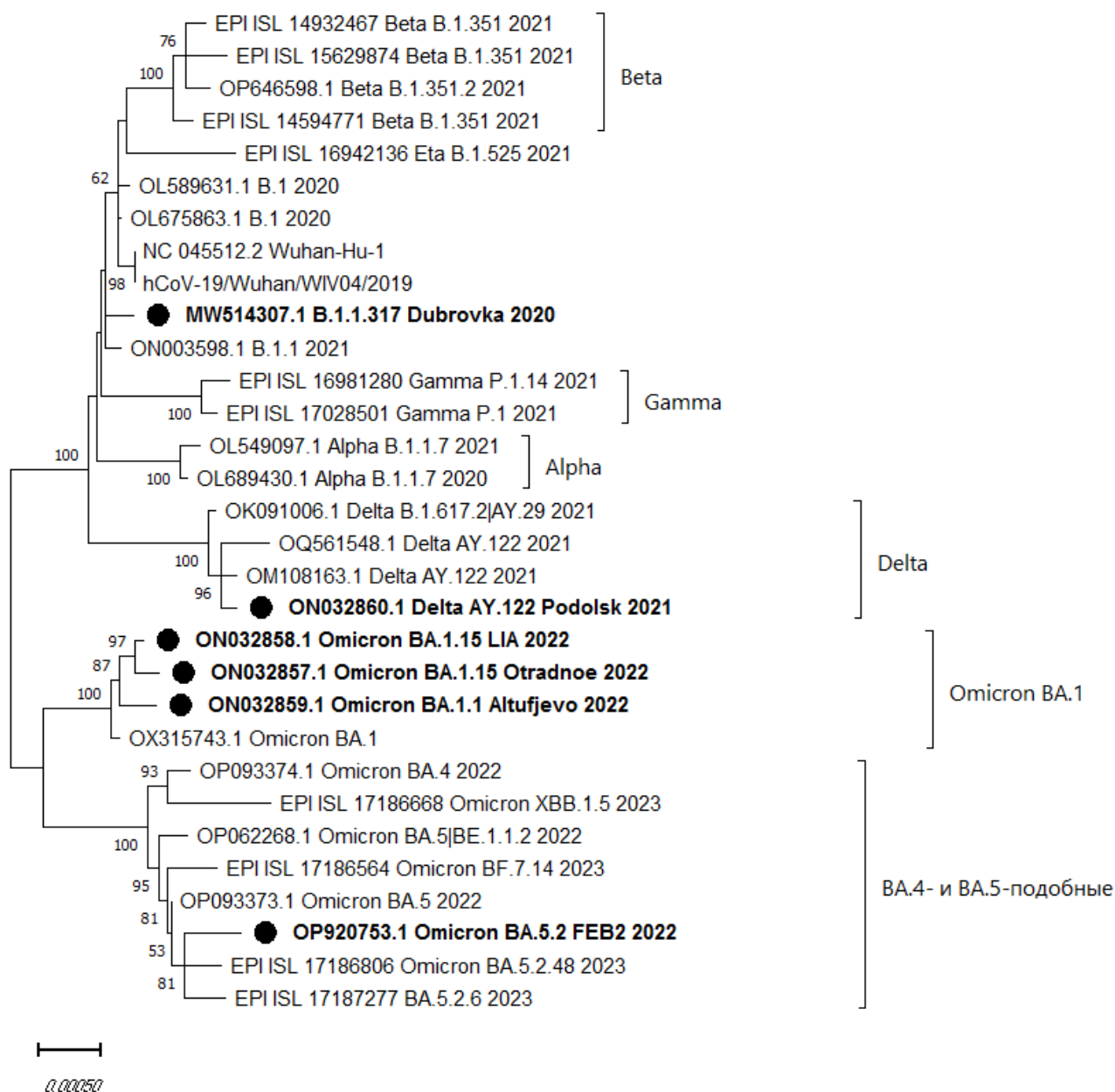
Стрелкой отмечены характерные шипы (тримеры S-белка) на поверхности коронавируса. Негативное контрастирование, увеличение 40000х. А и Б представляют собой разные поля зрения для одного и того же препарата. ТЭМ выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (Соколова О.С., Глухов Г.С., Моисеенко А.В.)

Рисунок 40 - Электронная микрофотография препарата штамма Dubrovka, инактивированного ультрафиолетом

Таксономическая принадлежность изолятов к виду *Betacoronavirus pandemicum* была установлена путем секвенирования полного вирусного генома с последующим филогенетическим анализом (Рисунок 41), а субвидовая таксономическая характеристика была дана с помощью онлайн-программы Rango (Таблица 44) [182]. Полногеномное секвенирование изолятов вируса, полученных в разные периоды пандемии COVID-19, показало, что они относятся к различным VOCs-вариантам - Wuhan-подобный, Delta, Omicron.

Далее для культивирования SARS-CoV-2 и моделирования вирусной инфекции *in vitro* мы использовали перmissive для вируса культуры клеток почки обезьяны Vero CCL-81 и клеток рака легкого человека Calu-3. Упомянутые клеточные модели коронавирусной инфекции позволяют оценивать вирусную инфекцию по таким показателям (критериям), как выраженность цитопатического действия (ЦПД), концентрация вирусной РНК, отражающая интенсивность вирусной репродукции в культуре клеток, инфекционная активность вируса. Преимуществом использования клеток Calu-3 является ее человеческое происхождение, что позволяет в экспериментах *in vitro* максимально приблизиться к условиям *in vivo* (клетки

эпителия дыхательных путей человека). Ценность культуры клеток Vero CCL-81 заключается в простоте культивирования и развитии выраженного ЦПД при заражении SARS-CoV-2, что позволяет ее использовать качестве индикаторной культуры клеток при титровании вируса и в реакции нейтрализации. В культуре клеток Vero CCL-81 возможно получение высоких титров вируса, что важно при наработке вирусного антигена, используемого для конструирования иммунохимических тест-систем.



Древо строили методом максимального правдоподобия, используя двухпараметрическую эволюционную модель Kimura. Надежность формирования узлов древа оценивали методом «бутстрэп»-анализа и выражали как процент от 500 альтернативных древ, поддерживающих данную группу. Знаком ● отмечены лабораторные изоляты SARS-CoV-2.

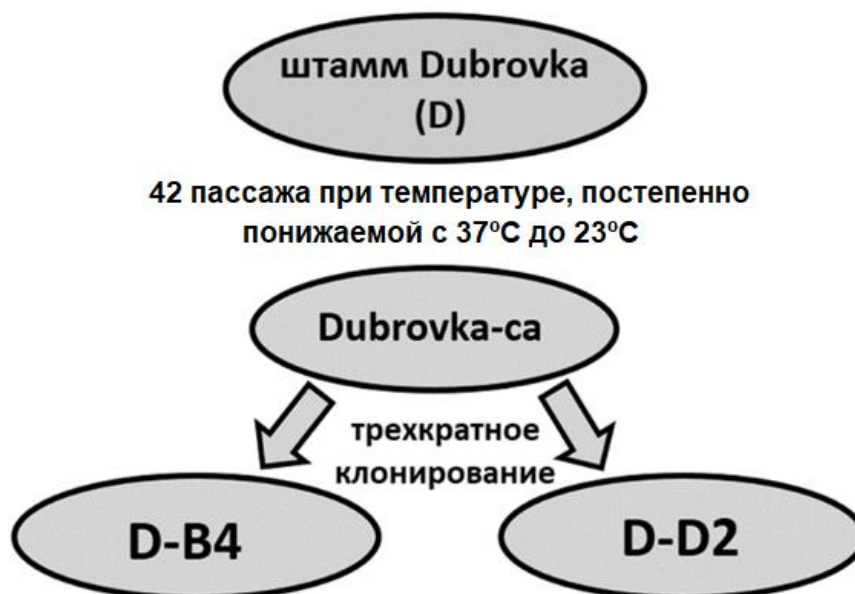
Рисунок 41 - Дендрограмма, построенная на основе сравнения нуклеотидных последовательностей геномов лабораторных изолятов SARS-CoV-2 и референсных штаммов

Таблица 44 - Таксономическая характеристика изолятов SARS-CoV-2

№п/п	Изолят вируса	Дата взятия образца	Пассажный уровень	Линия по Pango	Номер GenBank
1	Dubrovka	15.06.2020	1	B.1.1.317 Ухань-подобный	MW514307.1
2	Podolsk	27.07.2021	2	B.1.617.2.122/AY.122 Delta	ON032860.1
3	LIA	27.01.2022	2	BA.1.15 Omicron	ON032858.1
4	Altufjevo	25.01.2022	2	BA.1.1 Omicron	ON032859.1
5	Otradnoe	20.01.2022	2	BA.1.1 Omicron	ON032857.1
6	FEB2	06.10.2022	клинический образец	BA.5.2 Omicron	OP920753.1

### ***Получение и биологическая характеристика са мутантов SARS-CoV-2***

Штамм Dubrovka (D), филогенетически близкий штамму Wuhan-Hu-1 (GenBank ID NC\_045512.2), получен нами летом 2020 года в г. Москве путем изоляции в культуре клеток Vero CCL-81 из клинического образца пациента с подтвержденным диагнозом COVID-19 и охарактеризован путем полногеномного секвенирования (GenBank ID MW514307.1, клада GR по классификации GISAID, линия B.1.1.317 по классификации Pangolin). Вариант Dubrovka-са (D-са) получен в результате выращивания штамма D в культуре клеток Vero CCL-81 в течение 42 пассажей при постепенно понижаемой с 37<sup>0</sup>C до 23<sup>0</sup>C температуре (Рисунок 42).



Вариант Dubrovka-са получен путем адаптации к культуре клеток Vero CCL-81 штамма D в течение 42 пассажей при температуре, постепенно понижаемой до 23<sup>0</sup>C. Клоны-мутанты D-B4 и D-D2 получены путем трехкратного клонирования Dubrovka-са при температуре 23<sup>0</sup>C.

Рисунок 42 - Схема получения са мутантов штамма D

Клоны D-B4 и D-D2 получены путем трехкратного клонирования методом предельных разведений варианта D-са в 96-луночных планшетах при температуре 23<sup>0</sup>С. Поскольку в данных условиях ЦПД, вызванное единичными инфекционными вирионами, слабовыражено, для выявления зараженных лунок проводили ОТ-ПЦР-РВ анализ образцов культуральной жидкости каждой лунки на наличие и содержание РНК SARS-CoV-2.

Для вариантов штамма Dubrovka (D-са, D-B4 и D-D2) определены полные последовательности геномов (GenBank ID ON040960.1, ON059701.1 и ON040961.1, соответственно). Первичный анализ геномов *са* мутантов вируса выявил значительное количество нуклеотидных замен, большинство из которых были несинонимичными (Таблицы 45, 46). В геноме неклонированного варианта D-са в результате холодной адаптации в культуре клеток Vero CCL-81 произошло 17 нуклеотидных замен, из которых 16 приводили к аминокислотным заменам. В геномах *са* клонов D-B4 и D-D2 обнаружено 16 и 20 нуклеотидных замен, которые привели к 14 и 17 аминокислотным заменам, соответственно. В *S*-гене *са* мутантов было локализовано наибольшее число несинонимичных замен – 6 и 7 для клонов D-B4 и D-D2, соответственно.



Таблица 45 - Нуклеотидные замены в геноме *sa* мутантов SARS-CoV-2 (сравнение с родительским штаммом D)

Мутант штамма D	ORF1ab									Гены структурных белков		
	nsp3	nsp4	nsp5	nsp6	nsp9	nsp10	nsp12	nsp14	nsp16	S	E	M
D-B4	T6763C	A8982C*	C10233T	-	G12754N	C13126T	T13295A	-	T20743C C21033T	G21622T* A22943C C23926G C24174A* A24467C T24959C	G26213A	C26471T
D-D2	C3496S T6763C C7042T	C8391A	G10489T	T11299C	G12754N	-	T13295A	A18817T	A20910C*	C21616T* G21621A* A22943C C23926G A24467C T24959C T25241G*	G26245A* C26262T	C26471T

ORF – открытая рамка считывания; nsp – неструктурный белок; структурные белки: S – spike (шиповидный), E – envelope (оболочечный), M – membrane (мембранный), N – nucleocapsid (нуклеокапсид). Знаком «\*» отмечены уникальные замены по отношению к геномам SARS-CoV-2, депонированным в GenBank

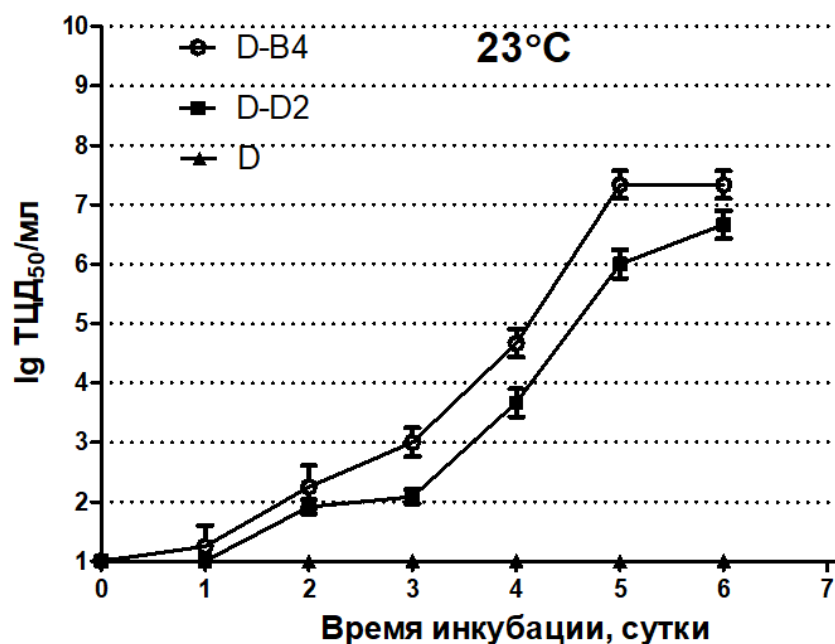
Таблица 46 - Аминокислотные замены в белках *sa* мутантов SARS-CoV-2 (сравнение с родительским штаммом D)

Мутант штамма D	ORF1ab									Структурные белки		
	nsp3	nsp4	nsp5	nsp6	nsp9	nsp10	nsp12	nsp14	nsp16	S	E	M
D-B4	I2181T	I2921H*	L3338F	-	G4178?	T4302I	N4358K	-	T6938I	G35V* E475D P803R Q884K* Q893H F1147F	V14I	T7I
D-D2	A1092G I2181T T2274I	Q2724K	C3423F	I3693T	G4178?	-	N4358K	-	D6897A*	T33I* G35S* E475D P803R Q893H F1147F C1241W*	T30I	T7I

ORF – открытая рамка считывания; nsp – неструктурный белок; структурные белки: S – spike (шиповидный), E – envelope (оболочечный), M – membrane (мембранный), N – nucleocapsid (нуклеокапсид). Знаком «\*» отмечены уникальные замены по отношению к геномам SARS-CoV-2, депонированным в GenBank.

### Выявление вероятных маркеров аттенуации *sa* мутантов SARS-CoV-2 *in vitro*

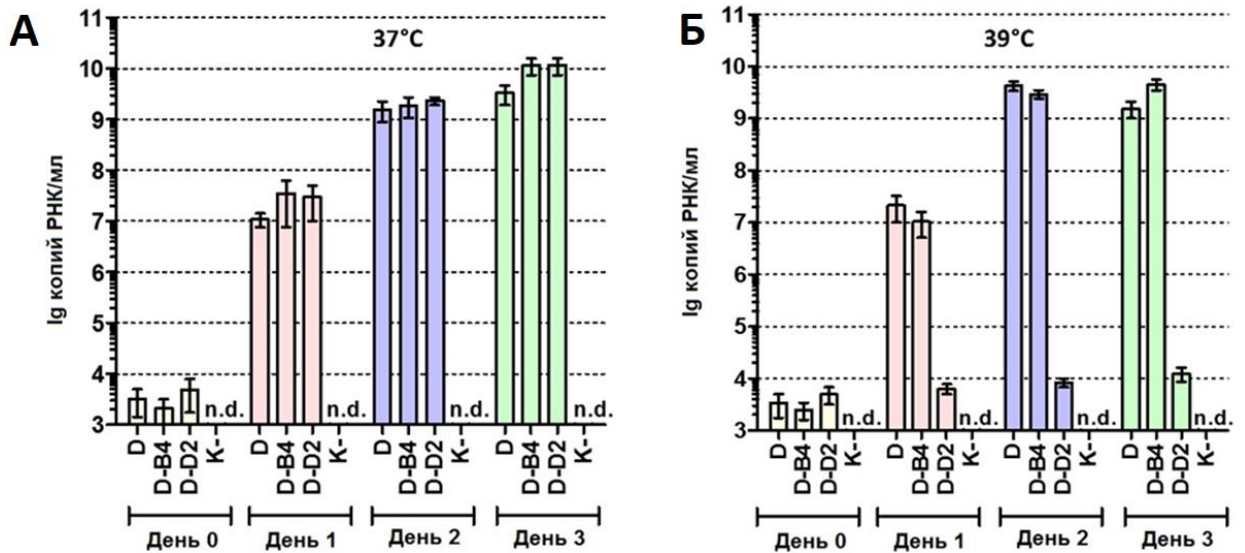
В экспериментах по заражению сирийских хомячков было выявлено снижение вирулентности мутантов D-B4 и D-D2 по сравнению с родоначальным штаммом D. Поскольку маркерами аттенуации холодоадаптированных вирусов являются *sa* фенотип и *ts* фенотип, мы оценили наличие этих маркеров у мутантов D-B4 и D-D2. Штаммы D-B4 и D-D2 обладали *sa* фенотипом, так как эффективно размножались в культуре клеток Vero CCL-81 при температуре 23°C, достигая на 5 день титра 6,7 – 7,3 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, тогда как родительский штамм D в этих условиях не размножился (Рисунок 43).



Клетки Vero CCL-81 заражали штаммом D и мутантами D-B4 и D-D2 (MOI 0,001 ТЦД<sub>50</sub> на клетку). Ежедневно отбирали культуральную жидкость и определяли в ней титр вируса. Средние значения по результатам двух независимых экспериментов. Отрезки - разница между двумя отдельными значениями.

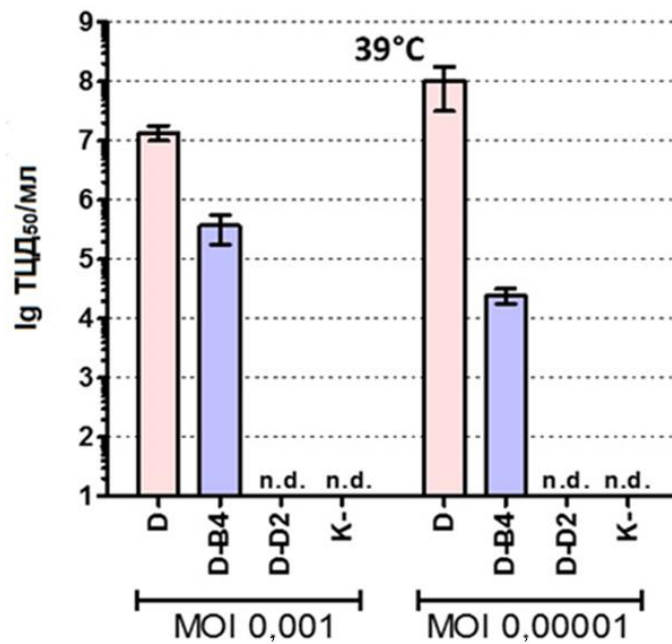
Рисунок 43 - Кинетика репродукции вариантов SARS-CoV-2 при температуре 23°C в культуре клеток Vero

При температуре 37°C репродуктивная активность мутантов D-B4 и D-D2 в клетках Vero CCL-81 была сопоставима со штаммом D (Рисунок 44). При температуре 39°C штаммы D и D-B4 эффективно размножались, о чем свидетельствует прирост концентрации вирусной РНК на 2 день п.и., тогда как штамм D-D2 при температуре 39°C не размножился, проявляя выраженный *ts* фенотип (Рисунки 44, 45). Штамм D-B4 проявлял менее выраженные признаки *ts* фенотипа, сохранив ограниченную способность к размножению при температуре 39°C. При MOI 0,001 ТЦД<sub>50</sub> на клетку и температуре 39°C на 3 сутки п.и. разница в титре вируса со штаммом D составила 1,6 lg, тогда как при MOI 0,00001 ТЦД<sub>50</sub> на клетку увеличивалась до 3,6 lg (Рисунок 45).



МОИ 0,001 ТЦД<sub>50</sub> на клетку. Средние значения по результатам двух независимых экспериментов. Отрезки - разница между двумя отдельными значениями. n.d. – не обнаружено.

Рисунок 44 - Концентрация вирусной РНК в клетках Vero CCL-81 при заражении штаммом D и мутантами D-B4 и D-D2 при температуре культивирования 37<sup>0</sup>C или 39<sup>0</sup>C

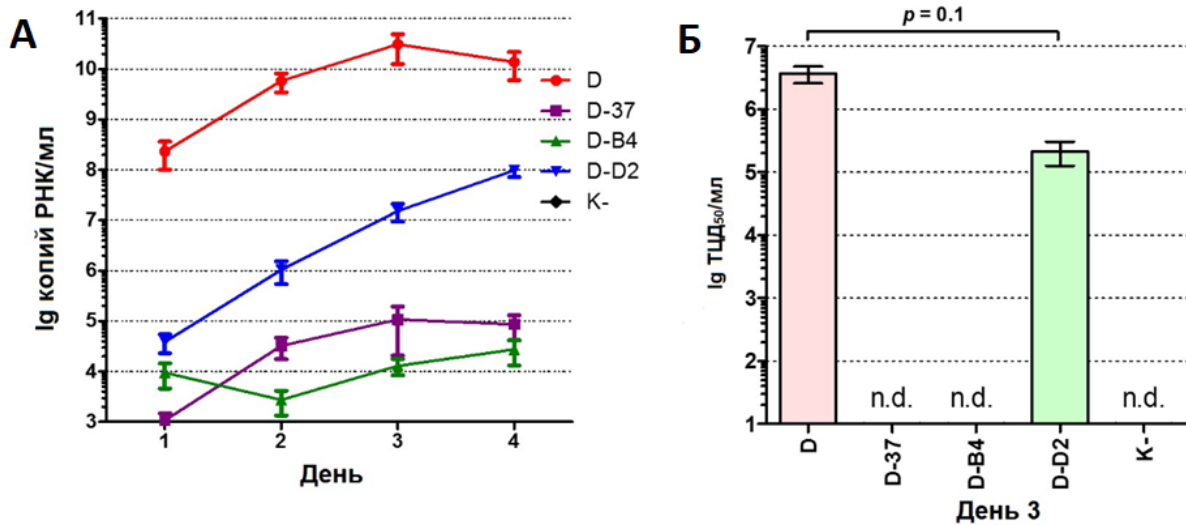


Средние значения по результатам двух независимых экспериментов. n.d. – не обнаружено.

Рисунок 45 - Титр вируса в клетках Vero CCL-81 на 3 сутки п.и. штаммом D и мутантами D-B4 и D-D2 при температуре культивирования 39<sup>0</sup>C и разной МОИ

Поскольку оба *sa* мутанта D-B4 и D-D2 независимо от наличия *ts* фенотипа обладали сниженной вирулентностью для хомячков, мы предположили, что не только *sa* фенотип и температурная чувствительность являются вероятными маркерами аттенуации вируса. С целью оценки видовой и тканевой специфичности мутантов D-B4 и D-D2 было проведено сравнение

их репродуктивной активности в клетках рака легких человека Calu-3 и в клетках почки обезьяны Vero CCL-81. Штамм D-B4 не размножался в клетках Calu-3, тогда как D-D2 размножался, но достоверно медленнее штамма D (Рисунок 46).



А. Накопление вирусной РНК с 1 по 4 день. Б. Титр вируса на 3-й день. Средние значения по результатам трех независимых экспериментов. MOI 0,001 ТЦД<sub>50</sub> на клетку. n.d. – не обнаружено.

Рисунок 46 - Кинетика репродукции вариантов SARS-CoV-2 в клетках Calu-3 при температуре культивирования 37<sup>0</sup>С

Материалы раздела 3.3.2 опубликованы [418; 634–639]

### 3.3.3 Оценка вирулентности, иммуногенности и протективной активности холодаадаптированных штаммов SARS-CoV-2 на животной модели COVID-19

Для моделирования коронавирусной пневмонии использовали золотистых сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*, далее – хомячки) и Ухань подобный штамм D. Среди чувствительных к SARS-CoV-2 животных хомячки представляют особый интерес, поскольку ACE2 рецептор хомячков схожи с аналогичным рецептором человека и способен с высокой аффинностью связываться с RBD-доменом SARS-CoV-2. Модель COVID-19 на основе хомячков широко применяется при проведении доклинических исследований вакцин и лекарственных препаратов [620]. Клинические особенности заболевания, вирусная репродукция в разных органах, гистопатологические изменения и иммунные реакции у хомячков, инфицированных SARS-CoV-2, очень похожи на те, которые описаны у пациентов с COVID-19.

Оценку вирулентности, иммуногенности и протективной активности *sa* мутантов SARS-CoV-2 проводили на хомячках согласно схеме (Рисунок 47). Хомячкам интраназально вводили по 100 мкл вирусного материала (штамм D) в дозе 4,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/голову, группе негативного контроля вводили ФСБ. На 4-й день после заражения животных гуманно умерщвляли и

отбирали органы, гомогенизировали (1:1 по объему в среде ДМЕМ) и получали экстракты для определения в них концентрации вирусной РНК и инфекционного титра вируса. Ежедневно оценивали состояние животных и каждые 2 дня проводили контроль веса. Левое лёгкое хомячков фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 ч, обезвоживали, заливали в парафиновую среду Histomix («BioVitrum», Russia) и использовали для гистологического исследования. Через 21 день п.и. у животных отбирали кровь для оценки иммуногенности и интраназально заражали животных (по 5 голов в группе) штаммом D в дозе 4,0 Ig ТЦД<sub>50</sub>/голову. Ежедневно оценивали состояние животных и каждые 2 дня проводили контроль веса. Через 4 суток после заражения животных гуманно умерщвляли, извлекали легкие, головной мозг и другие органы и готовили для определения титра вируса, концентрации вирусной РНК и гистологического исследования как описано выше.

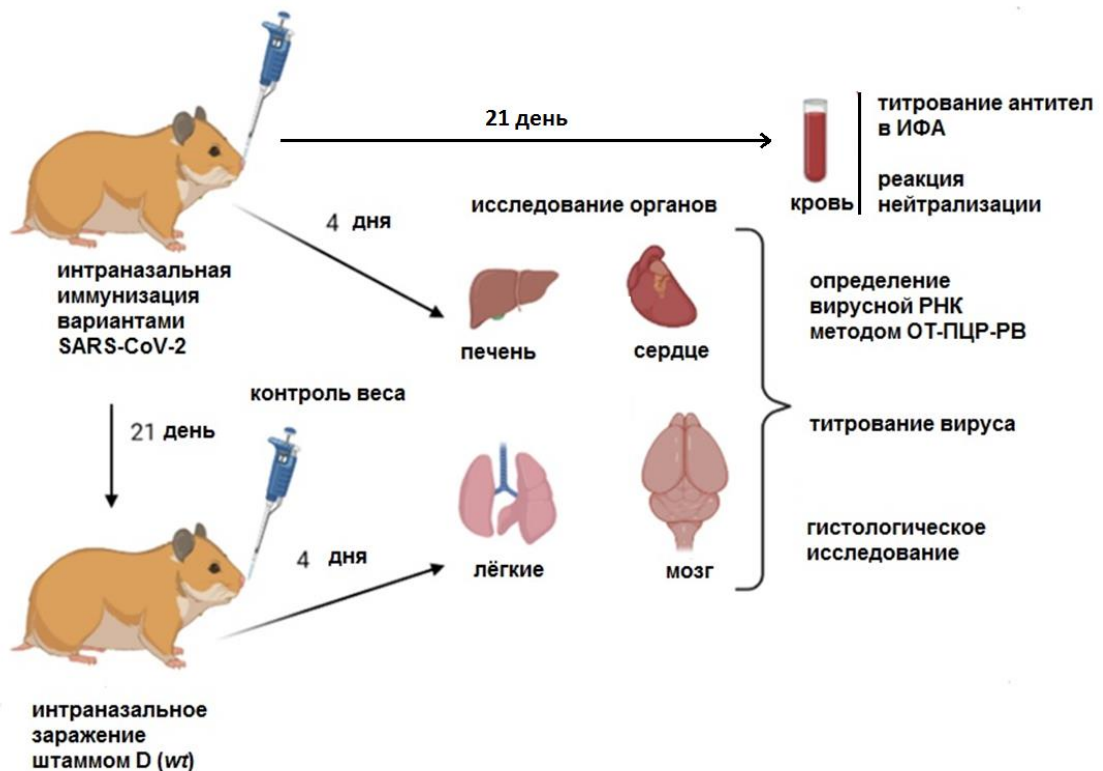
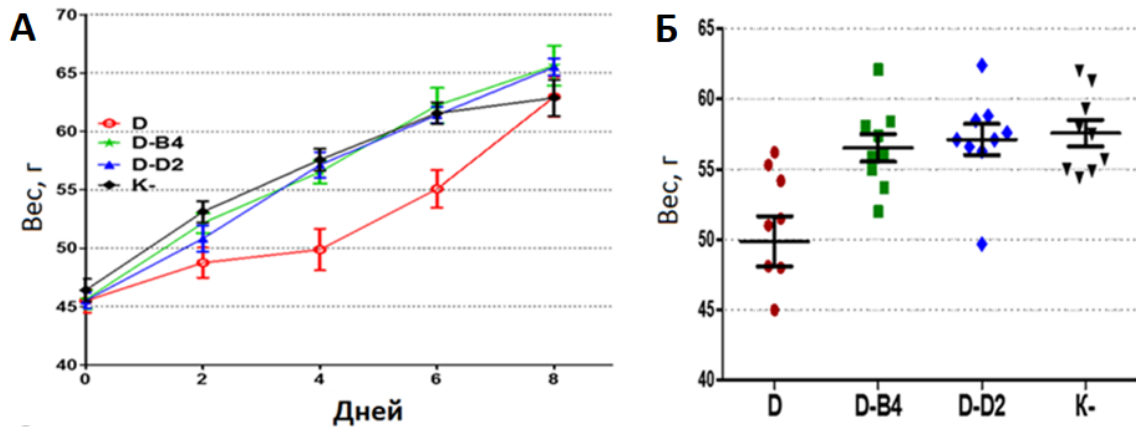


Рисунок 47 - Схема дизайна исследования по оценке вирулентности, иммуногенности и протективной активности са мутантов SARS-CoV-2

### **Оценка вирулентности вариантов штамма D**

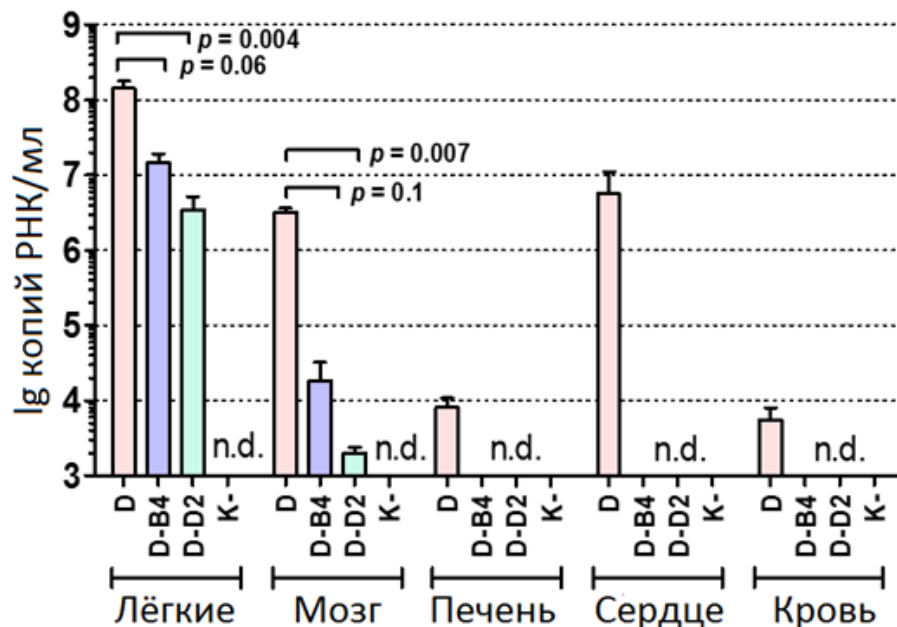
У хомячков, зараженных интраназально са мутантами D-B4 и D-D2, не наблюдалось задержки в приросте веса и изменений в поведении по сравнению с незараженными животными (Рисунок 48). Напротив, при заражении штаммом D в период со 2 по 6 день отмечалась достоверная задержка в приросте веса животных, достигшая максимальных значений на 4 день – 13,4% ( $p < 0,05$ ), что сопровождалось снижением аппетита, вялостью и сонливостью.



А. Динамика веса хомячков по дням. Б. Распределение веса хомячков на 4 сутки п.з. К- – незараженные животные. N=9/группу;  $p < 0,05$  на 2, 4 и 6 дни (U-критерий Манна-Уитни). Отрезки означают среднее значение  $\pm$  SEM. n.d. – не обнаружено.

Рисунок 48 - Вес хомячков, зараженных штаммом D и мутантами D-B4 и D-D2

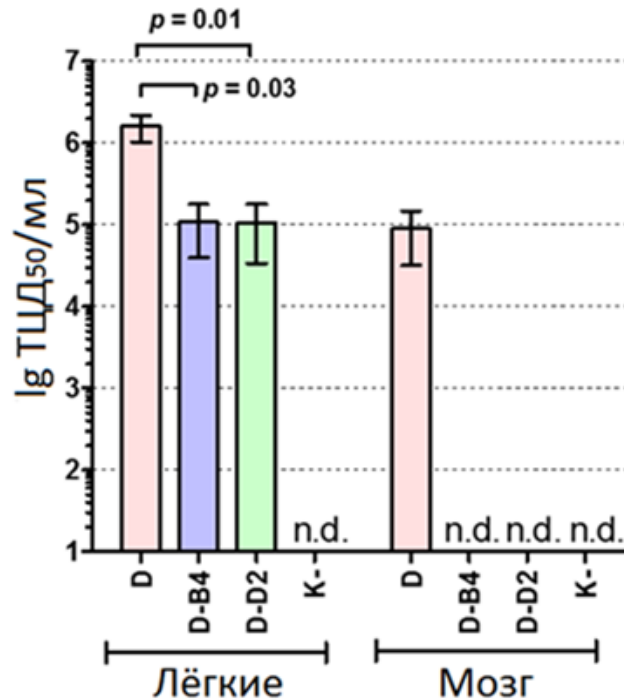
Репродуктивная активность штаммов D-B4 и D-D2 в легких, головном мозге и других органах хомячков на 4 сутки после заражения была достоверно более низкой по сравнению со штаммом D (Рисунки 49 и 50). Наименьшая концентрация вирусной РНК в легких наблюдалась при заражении штаммом D-D2 - 6,5 lg копий РНК/мл, что на 1,6 lg ниже, чем в контрольной группе ( $p < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни). Еще в большей степени снизилась репродуктивная активность штаммов D-B4 и D-D2 в мозге - на 2,2 и 3,2 lg, соответственно ( $p < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни).



N=4/группу. Отрезки - SEM. Предел чувствительности - 3,0 lg копий РНК/мл. К- - незараженные животные. n.d. – не обнаружено. Для сравнения показателей использован U-критерий Манна-Уитни.

Рисунок 49 - Концентрация вирусной РНК в гомогенатах органов хомячков, зараженных штаммом D и мутантами D-B4 и D-D2 на 4 сутки п.з.

Инфекционная активность вируса в легких животных на 4 сутки после заражения штаммами D-B4 и D-D2 была на 1,2 lg ниже, чем в контрольной группе ( $p < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни). Инфекционный вирус в мозге при заражении *sa* мутантами обнаружен не был, тогда как при заражении штаммом D достигал 5,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл гомогената (Рисунок 50). Важно отметить, что гомогенаты органов были токсичными для клеток Vero SCL-81, в которых проводилось титрование, что уменьшало предел чувствительности до 2,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.



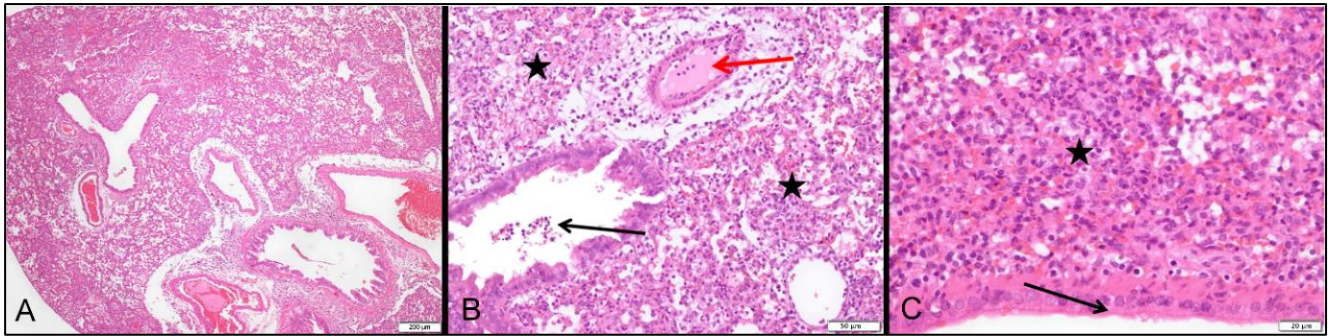
N=4/группу. Отрезки - SEM. Предел чувствительности – 2,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. K- - незараженные животные. n.d. – не обнаружено. Для сравнения показателей использован U-критерий Манна-Уитни.

Рисунок 50 - Титр вируса в гомогенатах легких и мозга хомячков, зараженных штаммом D и мутантами D-B4 и D-D2 на 4 сутки п.з.

На 4 день после интраназального заражения в лёгких хомячков всех групп развивались воспалительные изменения (Рисунки 51-53). Однако между группами были отмечены существенные отличия по характеру, тяжести и распространённости воспалительных изменений. Так, при заражении штаммом D в лёгких хомячков развивалась долевая интерстициальная пневмония, которая сопровождалась выраженными альтеративными и воспалительными изменениями: образованием обширных сливных безвоздушных очагов пневмонии, десквамацией и гибелью респираторного эпителия, образованием перибронхиальной и периваскулярной лимфогистиоцитарной инфильтрации, воспалительной инфильтрацией межальвеолярных перегородок, нарушениями со стороны кровеносной системы (выраженное полнокровие сосудов и микрососудов, периваскулярный отёк, интраальвеолярный



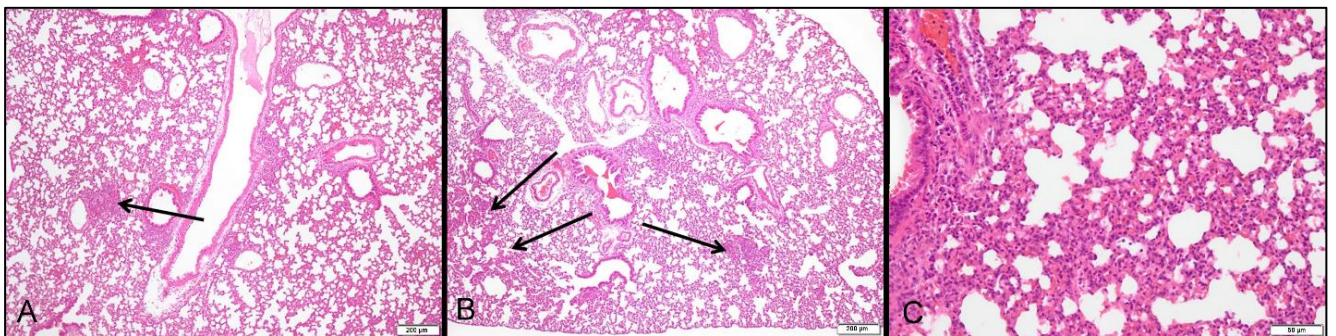
и интерстициальный отёк, интраальвеолярные кровоизлияния). Во всех долях наблюдали обширные сливные безвоздушные зоны и участки со сниженной воздушностью общей площадью до 80% (визуальная оценка) (Рисунок 51).



А – сливные очаги пневмонии; В – участок паренхимы лёгкого со сниженной воздушностью, расположенный перибронхиально (чёрной стрелкой указана бронхиола, просвет которой содержит единичные клетки десквамированного эпителия, макрофаги, эпителиальная выстилка сохранна, единичные клетки с дистрофическими изменениями; слабая воспалительная инфильтрация стенки бронха; красной стрелкой указана лёгочная артерия, расположенный вокруг неё диффузный воспалительный инфильтрат, периваскулярный отёк; звёздочками указаны участки паренхимы со сниженной воздушностью, утолщенные межальвеолярные перегородки, щелевидные просветы альвеол); С – фрагмент безвоздушного очага пневмонии, расположенного перибронхиально (стрелка – стенка бронха; звёздочка – очаг пневмонии, в котором межальвеолярные перегородки и просвет альвеол не определяются). Увел.: а –  $\times 40$ , б –  $\times 200$ , с –  $\times 400$ . Окр. гематоксилин и эозин.

Рисунок 51 - Морфологическая характеристика лёгких хомячков, зараженных штаммом D

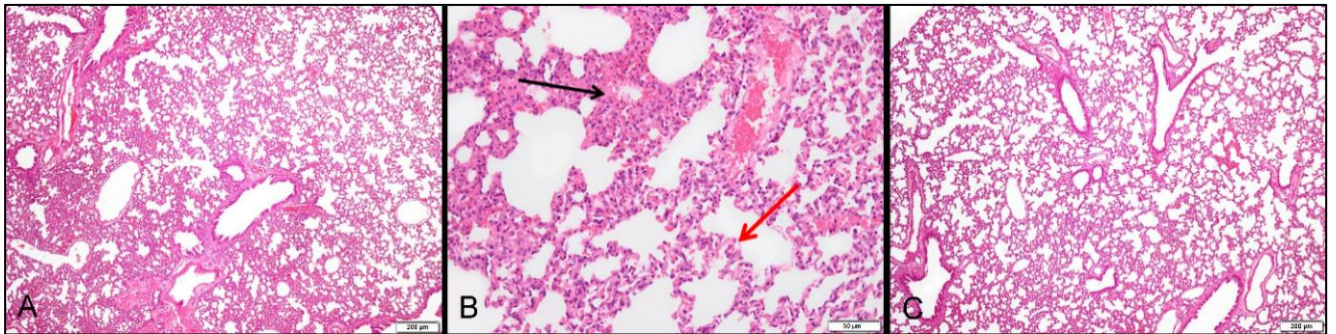
При заражении хомячков штаммами D-B4 и D-D2 в лёгких наблюдали морфологическую картину очаговой интерстициальной пневмонии, распространённость которой была значительно ниже, чем в группе штамма D (Рисунки 52, 53).



А, В – стрелками указаны очаги альвеолита; С – перибронхиальный очаг альвеолита: воздушность паренхимы снижена, просветы альвеол сужены, межальвеолярные перегородки утолщены за счёт воспалительной инфильтрации, полнокровие микрососудов. Увел.: А, В –  $\times 40$ , С –  $\times 200$ . Окр.: гематоксилин и эозин.

Рисунок 52 - Морфологическая характеристика лёгких хомячков, зараженных штаммом D-B4

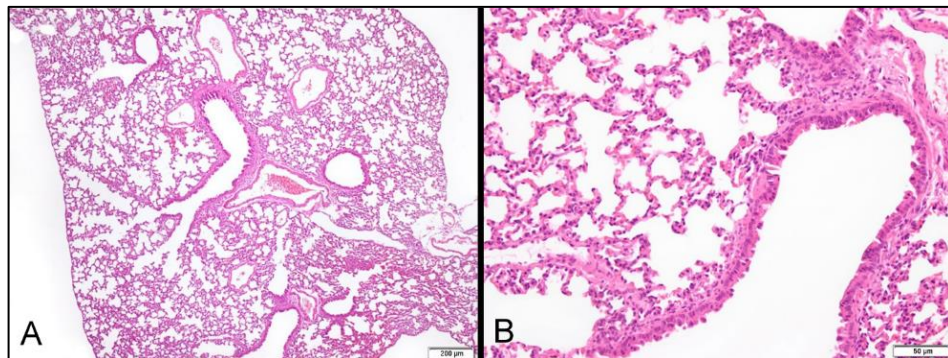
Гистоструктура лёгких в значительной части полей зрения объектива  $\times 10$  соответствовала таковой у хомячков контрольной группы. Просветы всех бронхов и бронхиол были свободными, содержали единичные десквамированные эпителиоциты. При визуальной оценке очаги альвеолита занимали незначительную часть площади срезов (до 15%) и содержали в себе небольшие безвоздушные очаги, которые часто располагались вокруг сосудов. В респираторном тракте отсутствовали признаки нарушения кровообращения (отёки, интраальвеолярные кровоизлияния) и выраженного повреждения межальвеолярных перегородок. В легких одного из двух обследованных хомячков, зараженных штаммом D-D2, патологических изменений не обнаружено (Рисунок 53С).



А – в нижнем левом углу микрофотографии расположены участки паренхимы со сниженной воздушностью (очаги альвеолита); В – очаг альвеолита (чёрная стрелка) граничит с альвеолами без воспалительных изменений (красная стрелка); С – фрагмент гистологического среза доли лёгкого здорового животного. Увел.: В, С –  $\times 40$ , В –  $\times 200$ . Окр.: гематоксилин и эозин.

Рисунок 53 - Морфологическая характеристика лёгких хомячков, зараженных штаммом D-D2

В легких незараженных животных патологических изменений не выявлено (Рисунок 54).



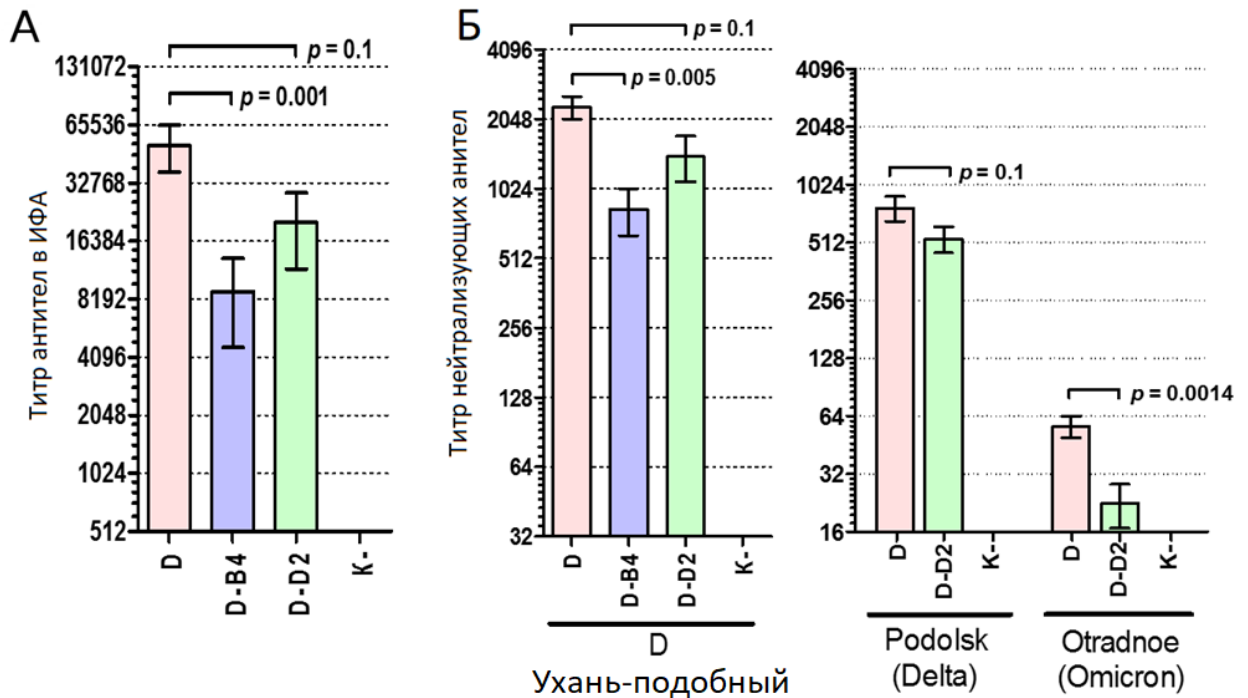
А – гистологический срез доли лёгкого и в нём: бронхи различных генераций, бронхиолы, лёгочные артерии вены, профили ацинусов; просветы бронхов и бронхиол свободные, паренхима органа выглядит воздушной; В – просвет бронхиолы свободный, эпителиальная выстилка сохранена, в стенке бронхиолы содержатся единичные лимфоциты; альвеолы, альвеолярные ходы и мешочки равномерно воздушные, межальвеолярные перегородки тонкие, интерстиций скудный, сосуды и капилляры умеренно полнокровные. Увел.: а –  $\times 40$ , b –  $\times 200$ . Окр. гематоксилин и эозин.

Рисунок 54 - Морфологическая характеристика лёгкого незараженного хомячка

### Иммуногенность и протективная активность вариантов штамма D

Через 21 день после однократной интраназальной иммунизации хомячков штаммом D и мутантами D-B4 и D-D2 в сыворотках крови животных обнаружены IgG к антигенам SARS-CoV-2 в титре  $51200 \pm 31353$ ,  $8960 \pm 3505$  и  $20480 \pm 7011$ , соответственно. Вируснейтрализующая активность сывороток крови иммунизированных штаммами D-B4 и D-D2 хомячков (титр ВНА  $1012 \pm 740$  и  $1408 \pm 701$ ) лишь незначительно уступала группе, зараженной родительским штаммом D ( $2304 \pm 572$ ) (Рисунок 55).

Кроме того, была изучена вируснейтрализующая активность полученных сывороток в отношении штаммов вирусов, относящихся к VOC Delta (штамм Podolsk) и Omicron (штамм Otradnoe). Нейтрализующая активность сывороток хомячков, иммунизированных штаммом D-D2, была снижена в 2,6 раза для варианта Delta ( $p = 0,03$ , U-критерий Манна-Уитни) и более чем в 60 раз для варианта Omicron ( $p = 0,0014$ , U-критерий Манна-Уитни) по сравнению с гомологичным штаммом D (Рисунок 55).

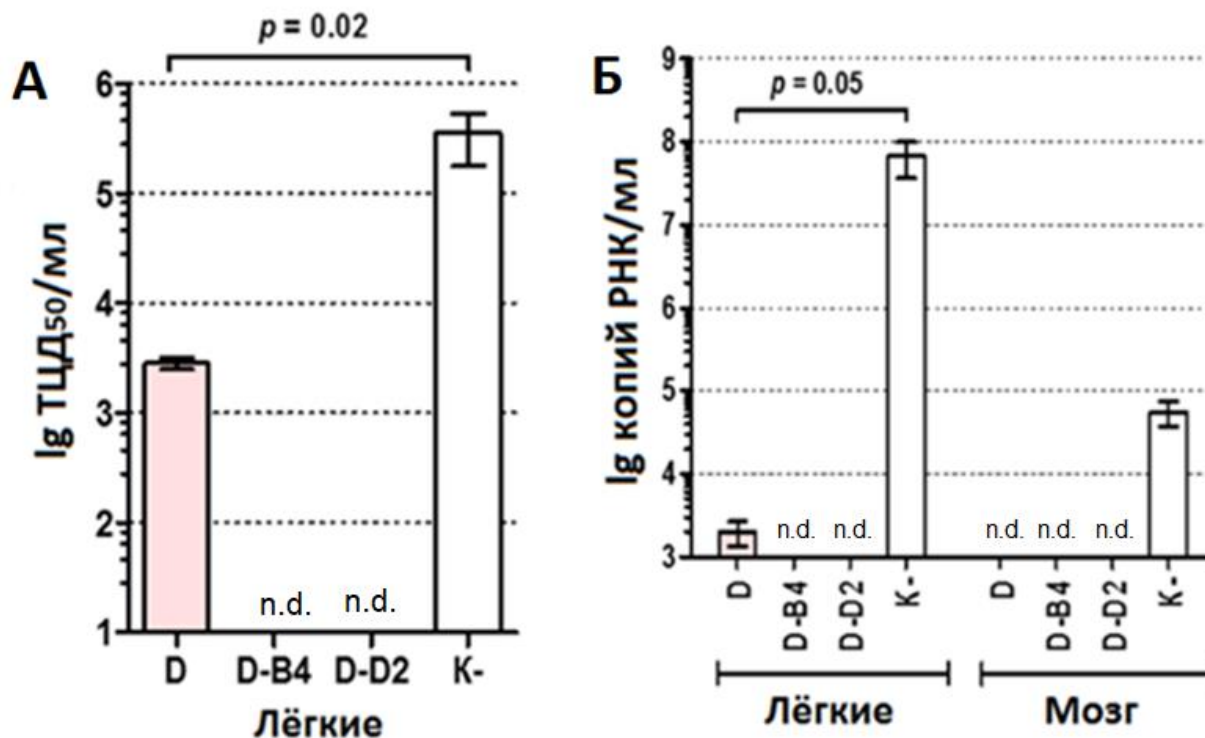


А. Титр суммарных IgG к SARS-CoV-2 в ИФА. Б. Титр вируснейтрализующих антител. N=5/группу. Отрезки - SEM. Для сравнения показателей использован U-критерий Манна-Уитни.

Рисунок 55 - Гуморальный иммунный ответ через 21 день после однократной иммунизации хомячков вариантами SARS-CoV-2

Однократная интраназальная иммунизация штаммами D-B4 и D-D2 полностью защищала хомячков от заражения штаммом D, о чем свидетельствовало отсутствие вирусной репродукции в легких, головном мозге и других органах на 4 день п.з. (Рисунок 56). Примечательно, что у хомячков, иммунизированных штаммом D, стерильный иммунитет не

сформировался - в легких животных данной группы на 4-й день п.з. выявлена вирусная РНК и инфекционный вирус в титре  $3,5 \pm 2,9$  lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. В органах неиммунизированных животных вирусная РНК определялась, причем наибольшее содержание вируса было обнаружено в легких –  $5,55 \pm 5,5$  lg ТЦД<sub>50</sub>/мл и  $7,83 \pm 7,7$  lg копий РНК/мл.



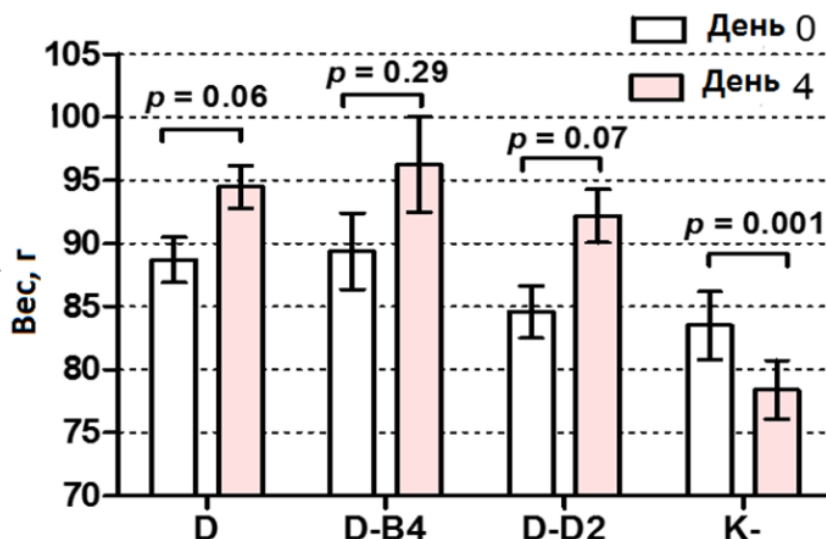
А. Титр вируса в легких и мозге. В. Концентрация вирусной РНК. Хомячков, иммунизированных штаммом D и мутантами D-B4 и D-B4 и животных негативного контроля, через 21 день п.и. заражали штаммом D в дозе  $4,0$  lg ТЦД<sub>50</sub>/голову. Через 4 суток после заражения животных гуманно умерщвляли, легкие, головной мозг и другие органы гомогенизировали (1:1 по объему в среде ДМЕМ) и определяли в них титр вируса и концентрацию вирусной РНК. N=5/группу. Отрезки - SEM. Предел чувствительности титрования –  $2,0$  lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, ОТ-ПЦР-РВ -  $3,0$  lg копий РНК/мл. n.d. – не обнаружено. Для сравнения показателей использован U-критерий Манна-Уитни.

Рисунок 56 - Уровень вирусной репродукции в органах иммунизированных хомячков на 4 день после заражения штаммом D

После экспериментального заражения штаммом D иммунизированные животные продолжали прибавлять в весе, тогда как неиммунизированные животные, напротив, теряли вес (Рисунок 57).

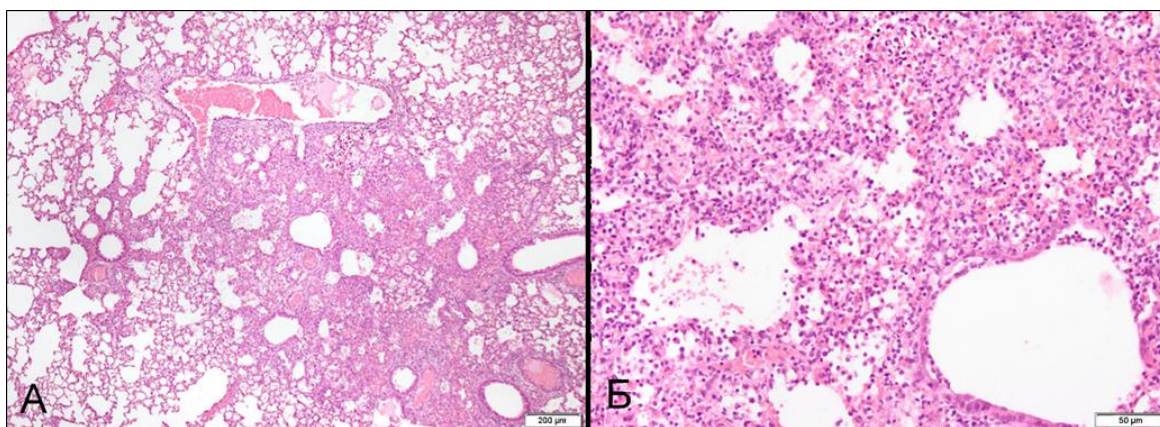
На 4 сутки после заражения в лёгких хомячков развивались воспалительные изменения, выраженные в различной степени. В контрольной группе неиммунизированных хомячков морфологическая картина соответствовала доле вирусной интерстициальной пневмонии в фазе экссудации. При визуальной оценке гистологических срезов площадь сливных безвоздушных зон пневмонии составила до 80% (Рисунок 58). Просветы бронхов и бронхиол, находящиеся в очагах пневмонии, были преимущественно свободными, некоторые из них

содержали небольшие пласты десквамированного эпителия. Прилегающая паренхима представляла собой безвоздушные поля, в которых просвет альвеол не определялся, межальвеолярные перегородки были разрушены за счёт воспалительного инфильтрата, отёка и гибели респираторного эпителия. Альвеолярные капилляры были в состоянии резкого полнокровия, расширены, в их просветах отмечался стаз эритроцитов.



N=5/группу. Отрезки - SEM. К- – неиммунизированные животные. Для сравнения показателей использован U-критерий Манна-Уитни.

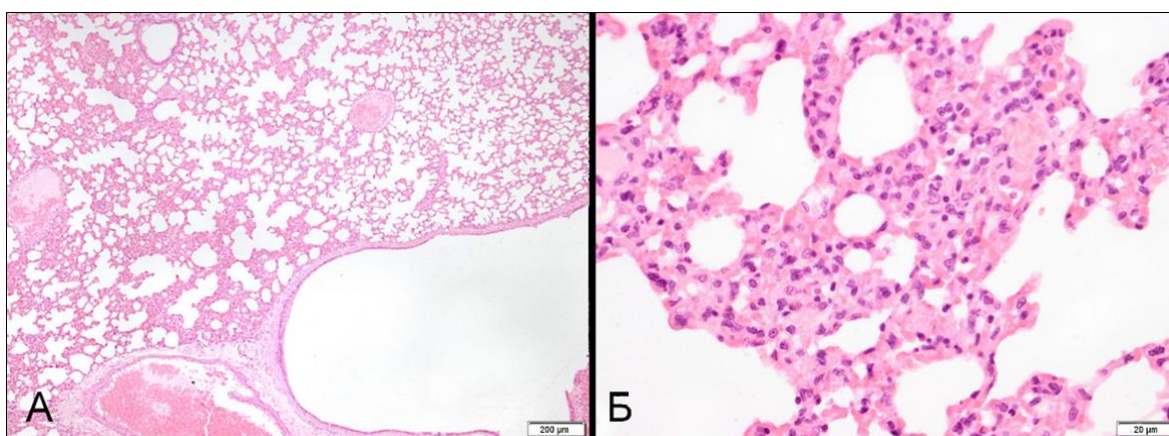
Рисунок 57 - Изменение веса хомячков, зараженных штаммом D



А – сливные очаги пневмонии; Б – фрагмент безвоздушного очага пневмонии, в котором расположена бронхиола (нижний правый угол); её просвет содержит небольшие пласты десквамированного эпителия, макрофаги; слабая воспалительная инфильтрация стенки бронха; в перибронхиолярной паренхиме межальвеолярные перегородки разрушены за счёт воспалительного инфильтрата, отёка и гибели респираторного эпителия; в просвете сохранившихся альвеол находятся фибриновые нити и клеточный экссудат. Увел: А –  $\times 40$ , Б –  $\times 200$ . Окр. гематоксилин и эозин.

Рисунок 58 - Морфологическая характеристика лёгких неиммунизированных хомячков через 4 дня после заражения штаммом D

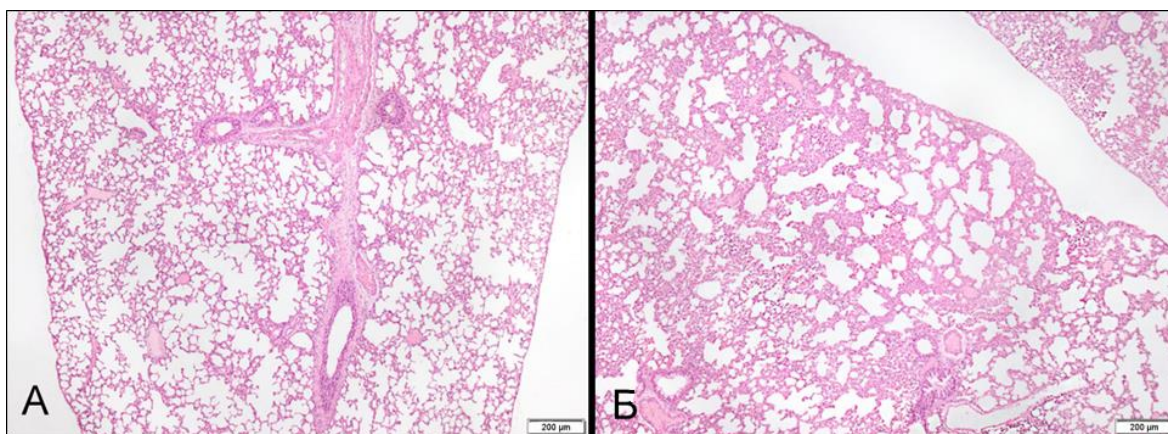
Выраженность воспалительных изменений в легких иммунизированных хомячков на 4 сутки после заражения штаммом D была значительно ниже, чем в контрольной группе (Рисунки 59-61). Гистоструктура легких в значительной части полей зрения объектива  $\times 10$  соответствовала нормальному строению. Однако, в гистологических срезах всех долей лёгких хомячков определялись небольшие участки лёгочной паренхимы с воспалительными изменениями, расположенные, как правило, перибронхиально, что соответствовало очаговому альвеолиту в стадии разрешения. При визуальной оценке очаги альвеолита занимали около от 15 до 30% площади срезов лёгких. Наименьшая площадь очагов альвеолита выявлена у животных, иммунизированных штаммом D-B4 - 15-20% (Рисунок 60), тогда как у иммунизированных штаммом D-D2 - достигала 30% (Рисунок 61).



А – очаги альвеолита (левая половина микрофото); Б – очаг альвеолита: воздушность паренхимы снижена, просветы альвеол сужены, межальвеолярные перегородки утолщены за счёт клеточной инфильтрации, в которой преобладают макрофаги, слабо выраженного отёка стромы межальвеолярных перегородок и полнокровия микрососудов. Увел.: А –  $\times 40$ , Б –  $\times 400$ . Окр.: гематоксилин и эозин.

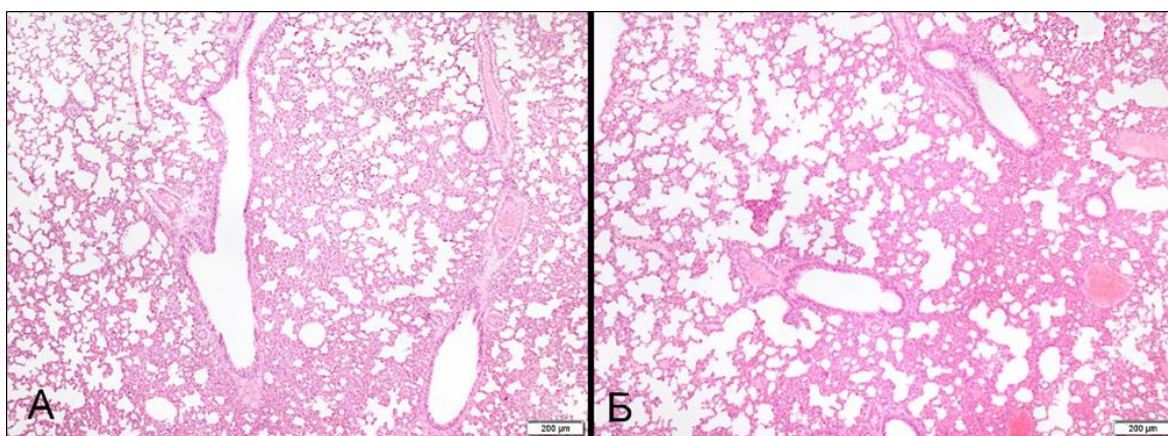
Рисунок 59 - Морфологическая характеристика лёгких хомячков, иммунизированных штаммом D, через 4 дня после повторного заражения штаммом D

В независимом эксперименте по иммунизации хомячков *ts* штаммом D-D2 степень патологических изменений в лёгких животных, зараженных штаммом D, определяли по Gruber A.D. с соавт. [515] и выражали в баллах. У иммунизированных животных совокупный балл тяжести составил в среднем 3,2 балла, в то время как у неиммунизированных животных 49,8, при максимально возможном количестве баллов 60. Таким образом, иммунизация хомячков штаммом D-D2 снижала совокупный балл тяжести при заражении родительским штаммом D в 15,7 раза ( $p < 0,01$ , U-критерий Манна-Уитни). При гистологическом исследовании в препаратах лёгких неиммунизированных незаражённых хомячков патологических изменений не выявлено.



А – фрагмент гистологического среза доли лёгкого хомячка № 1 без патологических изменений; Б – фрагмент гистологического среза доли лёгкого хомячка № 2: небольшой по площади субплевральный очаг альвеолита, утолщение межальвеолярных перегородок, снижение воздушности лёгочной паренхимы. Увел.: А, Б –  $\times 40$ , Окр.: гематоксилин и эозин.

Рисунок 60 - Морфологическая характеристика лёгких хомячков, иммунизированных штаммом D-B4, через 4 дня после заражения штаммом D



А, Б – перибронхиальные очаги альвеолита, расположенные в долях лёгкого хомячка №1 и № 2, соответственно. Увел.: А, Б –  $\times 40$ . Окр.: гематоксилин и эозин.

Рисунок 61 - Морфологическая характеристика лёгких хомячков, иммунизированных штаммом D-D2, через 4 дня после заражения штаммом D

Массовое применение живых вирусных вакцин, входящих в НКИ, позволило ликвидировать в глобальном масштабе натуральную оспу и поставить на грань исчезновения такие заболевания как полиомиелит, корь, краснуха, эпидемический паротит [14]. ЖАВ способны обеспечить формирование иммунного ответа как к структурным, так и неструктурным вирусным белкам и активацию не только гуморального, но и клеточного звена иммунитета [14; 621]. Одним из традиционных подходов к созданию живых вакцин, доказавших свою эффективность, является получение *sa* мутантов вируса [13]. Так, сезонные живые гриппозные вакцины, принципы создания которых сформулированы более 50 лет назад [622; 623], сочетают перекрестную протективную активность, простоту интраназального

введения, формирование мукозального иммунитета во входных воротах инфекции [314; 430; 624; 625]. Применение живых вирусных вакцин обосновано не только их высокой иммунологической эффективностью, но и экономической целесообразностью, поскольку они отличаются низкой себестоимостью производства [14]. В условиях появления новых VOCs SARS-CoV-2, «ускользающих» от лицензированных вакцин [289–292; 294–297], разработка живой аттенуированной вакцины против COVID-19 представляется важной и своевременной мерой.

Один из основных принципов разработки ЖАВ заключается в поддержании баланса между ослаблением вирулентности вакцинного штамма и сохранением способности вызывать протективный иммунный ответ. В связи с этим, профиль безопасности и протективной активности полученных нами *sa* мутантов SARS-CoV-2 находится в центре внимания.

При экспериментальном заражении хомячков штаммы D-B4 и D-D2 демонстрировали снижение вирулентности по всем изученным показателям – у них не замедлялся прирост массы тела, концентрация вирусной РНК и содержание инфекционного вируса в органах были достоверно ниже, чем при заражении штаммом D, животные сохраняли активность и хороший аппетит. Гистологическое исследование легких хомячков, зараженных *sa* мутантами, показало относительно слабые очаговые воспалительные изменения, тогда как при заражении вирулентным штаммом D развивалась долевая интерстициальная пневмония с площадью поражений до 80%. По данным ряда авторов аттенуированные вирусы SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 способны ограниченно размножаться в легких модельных животных и вызывать в них воспалительные изменения с минимальными гистопатологическими повреждениями [84; 416; 419; 626]. Репродукция вируса в легких и других жизненно важных внутренних органах, безусловно, нежелательна, однако, именно возникающий в органах и тканях после введения ЖАВ инфекционный процесс является необходимым условием формирования как системного, так и местного противовирусного иммунитета. Наименьшая репродуктивная активность в условиях *in vivo* отмечалась у температурочувствительного D-D2. Примечательно, что в мозге хомячков, зараженных *sa* мутантами, инфекционный вирус выявлен не был, тогда как при заражении родительским штаммом D титр вируса достигал 5,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл гомогената. Учитывая известную нейровирулентность SARS-CoV-2 для человека [627], снижение репродуктивной активности *sa* мутантов вируса в головном мозге хомячков при интраназальном введении уменьшает вероятность неврологических повреждений *in vivo*.

Высокая иммуногенность и протективная активность штамма D-D2 была подтверждена нами в независимом эксперименте с заражением иммунизированных хомячков родительским штаммом D. Результаты повторного эксперимента, опубликованные нами в Журнале микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии (№1, 2024 г.) подтвердили формирование



практически «стерильного» иммунитета, способного при однократной иммунизации не только защитить животных от развития тяжелой пневмонии, но и от продуктивной инфекции при заражении гомологичным штаммом [628].

В научной литературе описано получение аттенуированных штаммов SARS-CoV-2, обладающих *ts* фенотипом [417; 419; 429]. В нашем исследовании показано, что для *sa* вариантов SARS-CoV-2 *ts* фенотип не является обязательным условием снижения вирулентности. Как не обладающий *ts* фенотипом штамм D-B4, так и *ts* штамм D-D2 проявляли *att* фенотип для хомячков. Штамм D-D2 от родительского штамма D и штамма D-B4 отличался тем, что утратил способность размножаться при 39<sup>0</sup>C (*ts* фенотип), тогда как не обладающий *ts* фенотипом штамм D-B4, в отличие от штамма D и варианта D-D2, утратил способность заражать клетки легких человека Calu-3. Таким образом, изменение видовой специфичности вируса, наряду с *sa* и *ts* фенотипом, является вероятным фенотипическим маркером аттенуации вируса для хомячков.

Снижение вирулентности (*att* фенотип) вируса проявляется *in vitro* и *in vivo* в снижении вирусной репродукции по сравнению с родительским (диким) штаммом. Традиционным подходом к выявлению маркеров аттенуации является определение инфекционной активности вируса [13]. В настоящем исследовании, и в ряде аналогичных работ [419], в качестве альтернативного подхода к оценке интенсивности вирусной репродукции применяется количественное определение вирусной РНК, косвенно отражающей накопление инфекционного вируса. Метод ОТ-ПЦР-РВ позволяет проводить мониторинг вирусной репродукции с высокой чувствительностью и специфичностью, снижает длительность и трудоемкость анализа, по сравнению с титрованием. Немаловажно, что цитотоксичность гомогенатов органов не оказывает негативного влияния на результаты количественного определения вирусной РНК, в отличие от титрования в культуре клеток. Таким образом, применение количественной ОТ-ПЦР-РВ для оценки вирусной репродукции являются удобным и информативным инструментом контроля стабильности *att* фенотипа вируса и оценки эффективности иммунизации в экспериментах на животных.

Однократная интраназальная иммунизация штаммами D-B4 и D-D2 индуцировала у хомячков синтез нейтрализующих антител и защищала от заражения штаммом D и развития тяжелой пневмонии. Это согласуется с результатами аналогичных работ, где также показана высокая протективная активность аттенуированных штаммов SARS-CoV-2 при интраназальной иммунизации сирийских хомячков или трансгенных мышей hACE-2 (K18-hACE2) [83; 417; 419; 429].

Полученные *sa* мутанты D-B4 и D-D2 имели значительные отличия в последовательностях белков по сравнению с родительским штаммом D и между собой, которые

определяют фенотипические различия между вариантами. Изменения в видовой и/или тканевой специфичности штаммов D-B4 и D-D2 вероятно связаны с выявленными аминокислотными заменами в S-белке, ответственном за взаимодействие с вирусными рецепторами клетки. Ранее биоинформатическими методами показано, что при разных температурах S-белок может иметь активное и неактивное состояние. В частности, RBM, присутствующий на RBD-домене S1, чувствителен к температуре и теряет способность к связыванию с ACE2 рецептором при температуре 40°C [629]. Следовательно, нельзя исключать, что генетически-опосредованные изменения конформации S белка *sa* мутантов SARS-CoV-2 ассоциированы с изменением не только видовой специфичности вируса, но и с холодной адаптацией вируса. Косвенно об этом свидетельствует то, что у варианта D-37 (вариант штамма D, прошедший 42 пассажа в культуре клеток Vero CCL-81 при 37°C), не способного размножиться при 23°C и утратившего способность заражать клетки человека Calu-3, в S-белке всего 2 аминокислотные замены, тогда как у *sa* мутантов D-B4 и D-D2 - 6 и 7, соответственно. В определении *ts* фенотипа штамма D-D2 нельзя также исключать роли выявленных аминокислотных замен в неструктурных белках nsp3, nsp4, nsp5, nsp6, nsp16, характерных для штамма D-D2, но отсутствующих у D-B4, обладающего менее выраженным *ts* фенотипом. Однако, достоверно роль тех или иных мутаций можно определить только, применяя методы сайт-направленного мутагенеза и обратной генетики.

Очевидно, что без проведения испытаний на высших приматах или клинических испытаний установить инфекционность, реактогенность, иммуногенность (в том числе отсутствие эффекта «гиператтенуации» полученных *sa* мутантов) для человека представляется весьма затруднительным. В связи с этим, полученные нами на животной модели коронавирусной пневмонии результаты являются только одним из первых шагов к пониманию потенциала холодной адаптации SARS-CoV-2 в создании ЖАВ против COVID-19.

В настоящее время подавляющее большинство взрослого населения земного шара имеет маркеры перенесенного COVID-19 или вакцинированы. В связи с этим, стратегия безопасного применения ЖАВ против COVID-19 у взрослых может подразумевать «бустерную» иммунизацию только лиц, имеющих маркеры перенесенной новой коронавирусной инфекции и лиц, предварительно привитых инактивированной вакциной. Подобная схема вакцинации нашла применение в ряде стран, где в соответствии с рекомендацией ВОЗ предусмотрено введение не менее 1 дозы инактивированной полиомиелитной вакцины с последующей серией иммунизаций живой оральной полиомиелитной вакциной [630]. Рассматривая возможное клиническое применение ЖАВ против COVID-19, важно принимать также во внимание низкую восприимчивость детей к геновариантам SARS-CoV-2, циркулировавшим на ранних этапах

пандемии [229], что позволяет предполагать еще более низкую вирулентность для детей аттенуированных мутантов SARS-CoV-2 на основе Ухань-подобного штамма D.

Одним из ограничений проведенного исследования являлось то, что протективная активность *ca* штаммов вируса была исследована только против заражения гомологичным родительским штаммом D, близким штамму Wuhan-Hu-1 (номер GenBank NC\_045512.2). На вопрос, сможет ли такая иммунизация защитить от появившихся позднее VOCs, таких как Delta (B.1.617.2) и Omicron (B.1.1.529), а также вариантов, которые неизбежно появятся в будущем, можно было дать лишь гипотетический ответ. О потенциале перекрёстной протективной активности ЖАВ можно судить по частоте реинфекции SARS-CoV-2 – в ранних работах она оценивалась как редкое явление [631; 632]. Так, Pulliam J.R.C. с соавт. не обнаружили свидетельств повышенного риска повторного заражения, связанного с циркуляцией в Южной Африке вариантов Beta-(B.1.351) или Дельта-(B.1.617.2), но показали, что на пике четвертой волны (период доминирования варианта Omicron) риск реинфекции SARS-CoV-2 несколько повысился [633]. В ретроспективном исследовании, проведенном в Италии (период наблюдения до середины февраля 2022 года), выявлено 729 случаев реинфекции среди 119266 ранее инфицированных пациентов, что составило 0,61%. Отмечено небольшое увеличение частоты реинфекции во время волны Omicron, но риск повторного тяжелого заболевания или смерти оставался близким к нулю [631]. Однако, более поздние исследования показали, что реинфекция стала обычным явлением с момента появления варианта Omicron и дальнейшей его эволюции. В то же время, защитная эффективность первичной инфекции от развития тяжелой формы заболевания или летального исхода при повторном заражении вариантом Omicron оценивается в 97,3% (95% ДИ: 94,9-98,6%), независимо от варианта вируса, вызвавшего первичную инфекцию [492]. Регистрируемая в настоящее время низкая смертность и частота тяжелых форм COVID-19 отражает наличие популяционного иммунитета, сформировавшегося, в первую очередь, в результате ранее перенесенной SARS-CoV-2 инфекции, несмотря на появление новых вариантов вируса, что демонстрирует высокий потенциал ЖАВ в защите от новых VOCs.

В связи с вышеизложенным, гипотеза о способности полученных нами *ca* штаммов SARS-CoV-2 обеспечивать перекрёстную защиту против новых эпидемически значимых штаммов нуждалась в экспериментальном подтверждении. Для проверки этой гипотезы нами было проведено дополнительное исследование, результаты которого в диссертации не представлены, но опубликованы в Журнале микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии (№1, 2024 г.) [628]. Высокая иммуногенность и протективная активность *ca/ts/att* Ухань-подобного штамма SARS-CoV-2 D-D2 была подтверждена в независимом эксперименте по заражению иммунизированных хомячков не только родительским штаммом D, но и гетерологичными

штаммами Podolsk (Delta, AY.122), Otradnoe (Omicron, сублиния BA.1.1) и FEB2 (Omicron, сублиния BA.5.2). Полученные результаты подтвердили формирование практически «стерильного» иммунитета, способного при однократной иммунизации защитить животных от продуктивной инфекции и развития тяжелой пневмонии при заражении вирулентными штаммами вируса, в том числе гетерологичными.

Таким образом, адаптация SARS-CoV-2 к выращиванию при температуре 23°C в клетках почки обезьяны Vero приводит к аттенуации вируса для сирийских хомячков. Однократная интраназальная иммунизация хомячков *sa* мутантами SARS-CoV-2 вызывает сероконверсию, появление вируснейтрализующих антител и защищает животных от продуктивной инфекции и развития тяжелой пневмонии при экспериментальном заражении вирулентным штаммом. Получение *sa* мутантов SARS-CoV-2 является перспективной стратегией для получения кандидатных вакцинных штаммов и разработки живой аттенуированной вакцины против COVID-19.

*Материалы раздела 3.3.3 опубликованы [418; 628; 639].*

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполнения диссертационной работы было исследовано биологическое разнообразие возбудителей приоритетных вакциноуправляемых вирусных инфекций - ротавирусов и папилломавирусов, а также разработаны научные основы получения аттенуированных штаммов SARS-CoV-2, обладающих высокой иммуногенностью и протективной активностью для чувствительного хозяина.

На начальных этапах работ для решения задач диссертации на основе метода мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ разработаны экспериментальные тест-системы для дифференциального выявления широкого спектра возбудителей острых респираторных и кишечных вирусных инфекций, включая вирусы гриппа А и В, вирусы парагриппа 1, 2, 3, 4 типов, аденовирусы, бокавирусы, респираторно-синцитиальный вирус, риновирусы, энтеровирусы, коронавирусы человека, ротавирусы групп А и С, норовирусы, саповирусы, астровирусы, полиовирусы, вирусы гепатита А и Е, ортореовирусы млекопитающих, а также вирус краснухи. Была экспериментально обоснована высокая диагностическая эффективность применения метода мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ для дифференциального выявления вирусов - возбудителей ОРВИ и ОКИ. На основе методов мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ и нанопорового секвенирования разработаны новые подходы к генетической характеристике ротавирусов группы А, которые представляют собой не только эффективные инструменты эпидемиологического мониторинга ротавирусной инфекции, но и могут стать основой методов контроля подлинности и специфической активности при производстве поливалентной ротавирусной вакцины. По мере разработки и внедрения специфических препаратов для лечения респираторных и кишечных вирусных заболеваний, подобные тест-системы найдут более широкое применение и в клинической практике для постановки этиологического диагноза и назначения адекватного лечения.

Далее было исследовано биологическое разнообразие сезонных коронавирусов человека, ротавирусов группы А и папилломавирусов высокого и низкого онкогенного риска, циркулировавших на территории различных регионов РФ в последние годы. Решение перечисленных задач имеет большую теоретическую и практическую значимость для здравоохранения и таких дисциплин как медицинская вирусология, эпидемиология, вакцинология.

Так, на территории московского региона выявлена циркуляция всех сезонных коронавирусов человека, включая коронавирусы HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 и HCoV-NKU1, чем подтвержден тезис об их убиквитарности. Установлено, что коронавирусы HCoV-OC43 и HCoV-NL63 могут вызывать тяжелые респираторные заболевания у детей в возрасте до 5 лет, требующие госпитализации. Полученные результаты дают основания для

пересмотра существовавших ранее представлений об этиологической роли коронавирусов человека, как о возбудителях заболеваний, протекающих преимущественно в легкой форме в виде простудного заболевания.

Анализ разнообразия циркулирующих на территории московского региона геновариантов ротавирусов позволил определить основные тенденции в изменении структуры генотипов РВА и установить важную роль ротавирусов животных и межвидовой передачи в появлении патогенных для человека ротавирусов, имеющих эпидемический потенциал. Результаты определения генетической структуры ротавирусов, выявленных на обследуемой территории, могут быть использованы при выработке рекомендаций по составу отечественной ротавирусной вакцины.

Установлено, что на территории РФ циркулируют все клинически значимые типы папилломавирусов человека высокого и низкого онкогенного риска и изучена их распространенность. Полученные данные о генетическом разнообразии ВПЧ на территории РФ представляют интерес при разработке ВПЧ-вакцин, поскольку позволяют формулировать их состав с учетом региональных особенностей распространенности разных типов ВПЧ.

Следующий этап работ состоял в разработке научных основ создания живых аттенуированных вакцин против краснухи и COVID-19, причем конечным результатом достижения этой цели было получение кандидатных вакцинных штаммов. Теоретическая и практическая значимость полученных результатов определяется тем, что выявлены факторы и маркеры снижения вирулентности вирусов краснухи и SARS-CoV-2. В частности, установлено, что адаптация этих вирусов к выращиванию в культуре клеток почки обезьяны Vero при пониженной температуре приводит к их аттенуации. Полногеномная характеристика *ca* мутантов вирусов краснухи и SARS-CoV-2 позволила выявить набор нуклеотидных и аминокислотных замен, ассоциированных с приобретением *att* фенотипа.

Установлено, что для SARS-CoV-2 приобретение *ts* фенотипа не является единственным условием для аттенуации вируса. В снижении вирулентности вируса важную роль играет также смена хозяина, что сопровождается снижением или утратой мутантным вирусом способности заражать клетки легких человека *in vitro*. Возможность аттенуации SARS-CoV-2 в результате холодовой адаптации, первоначально продемонстрированная на Ухань-подобном штамме D, в дальнейшем была подтверждена нами с использованием Omicron-подобного штамма FEB2 (сублиния BA.5.2) [640]. В результате адаптации к росту в культуре клеток Vero при температуре 24°C штамм FEB2 приобрел *ca/ts/att* фенотип, утратив способность размножаться при температуре выше 37°C в культуре клеток и в легких хомячков, но при этом, благодаря эффективному размножению в носовых ходах, сохранил иммуногенность [640]. Разработаны методические подходы к выявлению маркеров аттенуации SARS-CoV-2 (*ca* и *ts* фенотип) в

условиях *in vitro*, которые могут быть в дальнейшем использованы для контроля стабильности *att* фенотипа вакцинных штаммов вируса в технологическом процессе производства ЖАВ.

Установлено, что однократная интраназальная иммунизация хомячков *ca* мутантами SARS-CoV-2 D-D2 и D-B4 вызывает у животных выработку вируснейтрализующих антител и защищает животных от продуктивной инфекции и развития тяжелой пневмонии при экспериментальном заражении родительским штаммом D. Впоследствии высокая иммуногенность и протективная активность *ca/ts/att* Ухань-подобного штамма D-D2 была подтверждена в независимом эксперименте по заражению иммунизированных хомячков родительским штаммом D и гетерологичными штаммами Podolsk (Delta, AY.122), Otradnoe (Omicron, сублиния BA.1.1) и FEB2 (Omicron, сублиния BA.5.2) [628]. Результаты повторного эксперимента, опубликованные нами в Журнале микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии (№1, 2024 г), подтвердили формирование практически «стерильного» иммунитета, способного при однократной иммунизации защитить животных не только от развития тяжелой пневмонии, но и от продуктивной инфекции при заражении как гомологичным, так и гетерологичными штаммами вируса [628].

Полученные результаты продемонстрировали, что холодовая адаптация вирусов краснухи и SARS-CoV-2, проводимая в клетках почки обезьяны Vero, является перспективной стратегией для получения кандидатных вакцинных штаммов этих вирусов. Важно отметить, что ВОЗ разрешает использование культуры клеток Vero для производства таких живых вакцин, как оральная полиомиелитная и ротавирусная вакцины.

Таким образом, задачи диссертационной работы успешно решены, а поставленная цель достигнута.

## ВЫВОДЫ

1. На основе методов мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ и нанопорового секвенирования разработаны тест-системы для дифференциального выявления широкого спектра возбудителей острых респираторных и кишечных вирусных инфекций, а также генетической характеристики ротавирусов группы А.

2. Установлено, что основной причиной госпитализации с острым гастроэнтеритом в стационары г. Москвы и внутрибольничной кишечной инфекцией детей в возрасте до 5 лет в период с 2009 по 2014 гг. являлись ротавирусы группы А. Второй по клинической значимости группой кишечных вирусов были норовирусы.

3. Показано, что ключевой тенденцией в изменении генетической структуры ротавирусов, циркулировавших на территории московского региона в период с 2009 по 2020 гг., было постепенное снижение частоты встречаемости генотипа G4P[8]I1 (с 39% до 9%), возрастание доли генотипа G9P[8]I1 (с 6% до 37%), а также появление в период 2018-2020 гг. не встречавшегося ранее DS-1-подобного реассортантного штамма G3P[8]I2 (до 24%), имеющего животное происхождение.

4. Установлено, что на территории Российской Федерации циркулируют и широко представлены все известные папилломавирусы человека высокого онкогенного риска (ВПЧ16, 18, 26, 31,33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82), а также ВПЧ низкого онкогенного риска (ВПЧ6, 11 и 44). В 2019 году в общей структуре доминировали ВПЧ16 - 13,8%, ВПЧ6 - 10,7%, ВПЧ51 - 6,8%, ВПЧ44 - 6,8%, ВПЧ53 - 6,3%, ВПЧ31 - 5,6%, ВПЧ56 - 5,5%, ВПЧ52 - 5,4%.

5. На территории московского региона выявлена циркуляция сезонных коронавируса человека HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 и HCoV-NKU1, что подтверждает тезис об их убиквитарности. Показано, что у детей в возрасте до 5 лет коронавирусы HCoV-OC43 и HCoV-NL63 могут являться причиной тяжелых респираторных заболеваний, требующих госпитализации.

6. Установлено, что вариант са39 штамма С-77 вируса краснухи в результате холодной адаптации к культуре клеток Vero приобрел 6 аминокислотных замен, в том числе 4 уникальных, которые играют ключевую роль в приобретении вирусом *sa* и *att* фенотипа. По своим биологическим свойствам вариант са39 может рассматриваться в качестве кандидата для разработки на его основе отечественной вакцины против краснухи.

7. Показано, что в результате адаптации к выращиванию в культуре клеток Vero при пониженной до +23°C температуре SARS-CoV-2 приобретает ряд несинонимичных мутаций в ORF неструктурных (nsp3, nsp4, nsp5, nsp6, nsp9, nsp10, nsp12, nsp16) и структурных (S, E, M) белков, определяющих его аттенуационный фенотип. В снижении вирулентности вируса



важную роль играют приобретение им температурной чувствительности и изменение видовой специфичности в результате адаптации к клеткам нового хозяина.

8. Установлено, что однократная интраназальная иммунизация золотистых сирийских хомячков *са* мутантами SARS-CoV-2 вызывает сероконверсию с образованием нейтрализующих антител и защищает животных от продуктивной инфекции и развития тяжелой пневмонии при экспериментальном заражении вирулентным штаммом. Холодовая адаптация является перспективной стратегией получения аттенуированных штаммов SARS-CoV-2, обладающих высокой иммуногенностью и протективной активностью для чувствительного хозяина.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Разработанные методические подходы к генетической характеристике ротавирусов на основе метода нанопорового секвенирования могут быть рекомендованы для внедрения в практику эпидемиологического мониторинга ротавирусной инфекции. Результаты оценки распространенности разных генотипов ротавирусов и папилломавирусов человека на территории РФ рекомендуется учитывать при разработке соответствующих отечественных вакцин, что позволит определять их состав с учетом региональных особенностей антигенного разнообразия вирусов. Аттенуированный штамм вируса краснухи С-77 может быть рекомендован для изучения в качестве кандидатного вакцинного штамма для разработки на его основе отечественной живой вакцины против краснухи. В диссертации эмпирически обоснована возможность получения аттенуированных штаммов SARS-CoV-2, обладающих высокой протективной активностью. Апробированные в диссертации методические подходы к аттенуации SARS-CoV-2 и выявлению маркеров аттенуации могут быть рекомендованы для разработки живой аттенуированной вакцины против COVID-19 и других коронавирусных заболеваний, а также для контроля стабильности фенотипа и генотипа вакцинных штаммов.

### **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Результаты проведенных исследований представляют собой научный задел для проведения научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ, направленных на совершенствование подходов к эпидемиологическому мониторингу и специфической профилактике приоритетных вакциноуправляемых инфекций.

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в совершенствовании тест-систем для генетической характеристики ротавирусов с учетом появления новых геновариантов вирусов и расширения знаний о реальном генетическом разнообразии патогенных для человека ротавирусов. Учитывая высокую стоимость расходных материалов для нанопорового

секвенирования, внедрение этой технологии в практику эпидемиологического мониторинга ротавирусной инфекции также требует разработки условий мультиплексного анализа, что позволит снизить себестоимость генетической характеристики одного вирусного штамма и масштабировать исследования.

Разработанные подходы к получению аттенуированных мутантов SARS-CoV-2, обладающих протективной активностью в отношении чувствительных лабораторных животных, представляют собой важный научный задел для создания ЖАВ против COVID-19. В качестве развития темы представляется целесообразным получение на основе аттенуированного *ca/ts/att* мутанта SARS-CoV-2 молекулярного клона, обеспечивающего стабильность аттенуационного фенотипа вируса, для использования в качестве донора аттенуации. Для получения молекулярного клона вируса оправдано применение «лигазного» подхода на основе серии плазмид, кодирующих полноразмерный геном вируса [440; 456]. Такая система позволила бы методами генетической инженерии своевременно актуализировать в вакцинном штамме последовательности, кодирующие S-белок, с учетом ожидаемых в предстоящем эпидемическом сезоне антигенных вариантов вируса, сохраняя при этом аттенуационный фенотип вируса.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

а.о. – аминокислотные остатки

АВ – астровирусы

АДВ – аденовирусы

БВ – бокавирусы

ВГА – вирус гепатита А

ВГЕ – вирус гепатита Е

ВГрА – вирус гриппа А

ВГрВ – вирус гриппа В

ВНА – вируснейтрализующие антитела

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВПГ-1 – вирус парагриппа 1 типа

ВПГ-2 – вирус парагриппа 2 типа

ВПГ-3 – вирус парагриппа 3 типа

ВПГ-4 – вирус парагриппа 4 типа

ВПК – внутренний положительный контроль

ВПЧ – вирус папилломы человека

ВПЧ-ВР - вирус папилломы человека высокого онкогенного риска

ВПЧ-НР - вирус папилломы человека низкого онкогенного риска

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ – дезоксинуклеозидтрифосфаты

ЖГВ – живая гриппозная вакцина

ИГВ – инактивированная гриппозная вакцина

ИФА – иммуноферментный анализ

КВ – коронавирусы

кДНК – молекула ДНК, синтезированная на матрице РНК в реакции обратной транскрипции

КОЧ – контрольный образец чувствительности

МТТ – метилтиазолилтетразолий бромид

н. – нуклеотид

НВ – норовирусы

НК – нуклеиновая кислота

НКИ - национальный календарь иммунизации

НПС – нанопоровое секвенирование

ОГЭ – острый гастроэнтерит

- ОКИ – острые кишечные инфекции
- ОП – оптическая плотность
- ОРВ – орторевовирусы
- ОТ – обратная транскрипция
- ОТ-ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция с детекцией в режиме реального времени со стадией обратной транскрипции
- п.з. – после заражения
- п.и. – «после иммунизации» или «после инфицирования» (в зависимости от контекста)
- п.н. – пар нуклеотидов
- ПВ – полиовирусы
- ПКО – положительный контрольный образец
- ПЦ – пороговый цикл
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция с детекцией в режиме реального времени
- р.с. – реакционная смесь
- РВ – риновирусы
- РВА – ротавирусы группы А
- РВ-С – риновирус С
- РВС – ротавирусы группы С
- РН – реакция нейтрализации
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- рНТФ – рибонуклеозидтрифосфаты
- РСВ – респираторно-синцитиальный вирус
- СВ – саповирусы
- ТЦД<sub>50</sub> - тканевых цитотоксических доз вируса, вызывающих цитопатическое действие в 50% лунок с чувствительной культурой клеток
- ТЭМ – трансмиссивная электронная микроскопия
- ФСБ – фосфатно-солевой буфер
- ЦПД – цитопатическое действие
- ЭВ – энтеровирусы
- ЭНР – экспериментальный набор реагентов
- 5'-NTR – 5'-nontranslated region (5'-нетранслируемый участок)
- АСЕ2 – angiotensin-converting enzyme 2 (ангиотензинпревращающий фермент 2)
- АТСС – American Type Culture Collection (Американская коллекция типовых культур)
- att* – attenuative (аттенуационный)
- ca* – cold-adapted (холодоадаптированный)

- COVID-19 – CoronaVirus Disease 2019 (заболевание, вызванное SARS-CoV-2)
- FDA – Food and Drug Administration (Управление по контролю за продуктами питания и лекарствами, США)
- GenBank ID – идентификационный номер GenBank
- GISAID – Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (Глобальная инициатива по обмену данными о птичьей гриппе)
- HCoV-229E – Human coronavirus 229E (коронавирус человека 229E)
- HCoV-NKU1 – Human coronavirus HKU1 (коронавирус человека HKU1)
- HCoV-NL63 – Human coronavirus NL63 (коронавирус человека NL63)
- HCoV-OC43 – Betacoronavirus 1 (коронавирус человека OC43)
- MERS-CoV – Middle East respiratory syndrome-related coronavirus (коронавирус ближневосточного респираторного синдрома)
- MOI – multiplicity of infection (множественность заражения)
- NCBI – National Center for Biotechnology Information (Национальный центр биотехнологической информации США)
- NGS – next-generation sequencing (секвенирование нового поколения)
- NP – nucleoprotein (нуклеопротеин)
- NSP – non-structural proteins (неструктурные белки)
- ORF – open reading frame (открытая рамка считывания)
- RBD – receptor-binding domain (рецептор-связывающий домен)
- RBM – receptor-binding motif (рецептор связывающий мотив)
- RCWG – Rotavirus Classification Working Group (Рабочая группа по классификации ротавирусов)
- RdRp – RNA-dependent RNA-polymerase (РНК-зависимая РНК-полимераза)
- SARS-CoV-2 – Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (новый коронавирус, возбудитель COVID-19)
- SD – standard deviation (стандартное отклонение)
- SEM – standard error of the mean (стандартная ошибка среднего)
- SP – structural proteins (структурные белки)
- Taq ДНК-полимераза – ДНК-полимераза бактерии *Thermus aquaticus*
- Tm – melting temperature (температура плавления)
- ts – temperature sensitive (температурочувствительный)
- VGARus – Virus Genome Aggregator of Russia (Российская платформа агрегации информации о геномах вирусов)
- VOCs – variants of concern (варианты, вызывающие озабоченность)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gorbalenya, A. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2 : Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses / A. Gorbalenya, S. Baker, R.S. Baric [et al.] // *Nature Microbiology*. – 2020. – Vol. 5. – № 4. – P. 536-544. DOI: 10.1038/s41564-020-0695-z.
2. Zhang, X.-Y. Biological, clinical and epidemiological features of COVID-19, SARS and MERS and AutoDock simulation of ACE2 / X.-Y. Zhang, H.-J. Huang, D.-L. Zhuang [и др.] // *Infectious Diseases of Poverty*. – 2020. – Vol. 9. – № 1. – P. 99. DOI: 10.1186/s40249-020-00691-6.
3. Kang, M. Zoonotic infections by avian influenza virus: changing global epidemiology, investigation, and control / M. Kang, L.-F. Wang, B.-W. Sun [et al.] // *The Lancet. Infectious Diseases*. – 2024. – Vol. 24. – № 8. – P. e522-e531. DOI: 10.1016/S1473-3099(24)00234-2.
4. Hirani, R. A Review of the Past, Present, and Future of the Monkeypox Virus: Challenges, Opportunities, and Lessons from COVID-19 for Global Health Security / R. Hirani, K. Noruzi, A. Iqbal [et al.] // *Microorganisms*. – 2023. – Vol. 11. – № 11. – P. 2713. DOI: 10.3390/microorganisms11112713.
5. Намазова-Баранова, Л.С. Новые горизонты Национального календаря профилактических прививок / Л.С. Намазова-Баранова, М.В. Федосеенко, А.А. Баранов // *Вопросы современной педиатрии*. – 2019. – Т. 18. – № 1. – С. 13-30. DOI: 10.15690/vsp.v18i1.1988.
6. *Lenette's Laboratory Diagnosis of Viral Infections* / К.Р. Jerome ред. . – 4th edition. – CRC Press, 2010. – 510 с.
7. *Diagnostic Molecular Pathology: A Practical Approach Volumes I and II as a set.* / C.S. Herrington, J.O. McGee ред. . – Oxford University Press, 1993. – 536 с.
8. Boonham, N. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing / N. Boonham, J. Kreuze, S. Winter [et al.] // *Virus Research*. – 2014. – Vol. 186. – P. 20-31. DOI: 10.1016/j.virusres.2013.12.007.
9. Burrell, C.J. History and Impact of Virology / C.J. Burrell, C.R. Howard, F.A. Murphy // *Fenner and White's Medical Virology*. – 2017. – P. 3-14. DOI: 10.1016/B978-0-12-375156-0.00001-1.
10. Kumar, A. Evolution of selective-sequencing approaches for virus discovery and virome analysis / A. Kumar, S. Murthy, A. Kapoor // *Virus Research*. – 2017. – Vol. 239. – P. 172-179. DOI: 10.1016/j.virusres.2017.06.005.
11. Jenner E. An Inquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae: A Disease Discovered in Some of the Western Counties of England, Particularly Gloucestershire, and Known by the Name of the Cow Pox / Jenner E. – London, 1798. – 75 с.

12. Маренникова, С.С. Патогенные для человека ортопоксвирусы / С.С. Маренникова, Щелкунов С.Н. – KMK Scientific Press Ltd., 1998. – 386 с.
13. Maassab, H.F. Development and characterization of cold-adapted viruses for use as live virus vaccines / H.F. Maassab, D.C. DeBorde // *Vaccine*. – 1985. – Vol. 3. – № 5. – P. 355-369. DOI: 10.1016/0264-410X(85)90124-0.
14. Minor, P.D. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges / P.D. Minor // *Virology*. – 2015. – Vol. 479-480. – P. 379-392. DOI: 10.1016/j.virol.2015.03.032.
15. Plotkin, S.A. Vaccines, vaccination, and vaccinology / S.A. Plotkin // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2003. – Vol. 187. – № 9. – P. 1349-1359. DOI: 10.1086/374419.
16. Sabin, A.B. Oral poliovirus vaccine: history of its development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the world / A.B. Sabin // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1985. – Vol. 151. – № 3. – P. 420-436. DOI: 10.1093/infdis/151.3.420.
17. Coleman, J.R. Virus attenuation by genome-scale changes in codon pair bias / J.R. Coleman, D. Papamichail, S. Skiena [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. – 2008. – Vol. 320. – № 5884. – P. 1784-1787. DOI: 10.1126/science.1155761.
18. Wimmer, E. Synthetic viruses: a new opportunity to understand and prevent viral disease / E. Wimmer, S. Mueller, T.M. Tumpey, J.K. Taubenberger // *Nature Biotechnology*. – 2009. – Vol. 27. – № 12. – P. 1163-1172. DOI: 10.1038/nbt.1593.
19. Ciarlet, M. Development of a rotavirus vaccine: clinical safety, immunogenicity, and efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq / M. Ciarlet, F. Schodel // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27 Suppl 6. – P. G72-81. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.09.107.
20. Патент № RU 2460803 С2 Российская Федерация. Способ дифференциальной диагностики респираторных вирусных инфекций методом мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени и перечень последовательностей для его осуществления : N 2010143681/10 : заявл. 27.10.2010 : опубликовано 10.09.2012 / Файзулов Е.Б., Никонова А.А., Оксанич А.С., Лободанов С.А., Малахо С.Г., Зверев В.В. ; заявитель Минпромторг России. - 17 с. : ил. - Текст: непосредственный.
21. Патент № RU2506317 Российская Федерация. Способ выявления кишечных вирусов в клинических образцах и воде методом мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени и перечень последовательностей для его осуществления : N 2012115031/10 : заявл. 17.04.2012 : опубликовано 27.10.2013 / Оксанич А.С., Файзулов Е.Б., Марова А.А., Никонова А.А., Зверев В.В., Егорова О.В., Калинкина М.А. ; заявитель Минпромторг России. - 19 с. : ил. - Текст: непосредственный.
22. Аммур, Ю.И. Разработка методов количественного определения вакцинных штаммов вирусов кори, эпидемического паротита и краснухи на основе ПЦР с детекцией в

режиме реального времени : специальность 03.02.02 «Вирусология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Ю.И. Аммуур. – НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН. - Москва, 2012. – 149 с.

23. Бахтояров, Г.Н. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов ротавирусов группы А, циркулирующих в Московском регионе : специальность 03.02.02 «Вирусология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Г.Н. Бахтояров. – Москва : НИИВС им. И.И. Мечникова. - Москва, 2016. – 200 с.

24. Дмитриев, Г.В. Фенотипические и генетические маркеры холодной адаптации вируса краснухи : специальность 03.02.02 «Вирусология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Г.В. Дмитриев. – Москва : НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН. - Москва, 2012. – 123 с.

25. Лободанов, С.А. Эффективность дифференциальной диагностики ОРВИ методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени : специальность 03.02.02 «Вирусология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / С.А. Лободанов. – Москва : НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН. - Москва, 2013. – 147 с.

26. Никонова, А.А. Выявление и идентификация респираторных вирусов методом мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени : специальность 03.00.06 «Вирусология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / А.А. Никонова. – НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН. - Москва, 2009. – 141 с.

27. Оксанич, А.С. Разработка молекулярных методов выявления в воде и клинических образцах вирусов - этиологических агентов заболеваний с фекально-оральным механизмом передачи : специальность 03.00.06 «Вирусология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / А.С. Оксанич. – Москва : НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН. - Москва, 2008. – 126 с.

28. Валлери-Радо, Р. Луи Пастер: История одного ученого: Пер. с 10-го фр. изд. с 6 прил., с согласия авт. и Пастера. Луи Пастер / Р. Валлери-Радо, И.И. Мечников, Л. Пастер; Н.Ф. Гамалея ред. – Одесса : тип. Л. Нитче, 1889. – 8 с. – Режим доступа: <https://search.rsl.ru/ru/record/01003623521> (дата обращения: 22.04.2023). – [Электронный ресурс].

29. Жирнов, О.П. Д.И. Ивановский - первооткрыватель вирусов как новой формы биологической жизни / О.П. Жирнов, Г.П. Георгиев // Вестник Российской Академии Медицинских Наук. – 2017. – Т. 72. – № 1. – С. 84-86.

30. Beijerinck, M. W. Ueber ein contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter. / Beijerinck, M. W. // Verh. Kon. Akad. Wetensch. – 1898. – № 3. – P. 3-21.

31. Мамедов, М.К. Вирусологии, как науке, 120 лет / М.К. Мамедов // Биомедицина (Баку). – 2012. – № 4. – С. 17-22.



32. Ханкишиев, Ф.Р. Памяти ученого, визуализировавшего вирусы / Ф.Р. Ханкишиев // Биомедицина (Баку). – 2021. – Т. 19. – № 1. – С. 23-25.
33. Быковский, А.Ф. Атлас вирусной цитопатологии / А.Ф. Быковский, Ф.И. Ершов, В.Я. Кармышева [и др.]. – Москва : Медицина, 1975. – 260 с.
34. Balayan, M.S. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route / M.S. Balayan, A.G. Andjaparidze, S.S. Savinskaya [et al.] // Intervirology. – 1983. – Vol. 20. – № 1. – P. 23-31. DOI: 10.1159/000149370.
35. Bishop, R.F. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis / R.F. Bishop, G.P. Davidson, I.H. Holmes, B.J. Ruck // Lancet (London, England). – 1973. – Vol. 2. – № 7841. – P. 1281-1283. DOI: 10.1016/s0140-6736(73)92867-5.
36. Kapikian, A.Z. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis / A.Z. Kapikian, R.G. Wyatt, R. Dolin [et al.] // Journal of Virology. – 1972. – Vol. 10. – № 5. – P. 1075-1081. DOI: 10.1128/JVI.10.5.1075-1081.1972.
37. Koff, R.S. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus like antigen associated with acute illness [Science 1973;182:1026-1028] / R.S. Koff // Journal of Hepatology. – 2002. – Vol. 37. – Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. – № 1. – P. 2-6. DOI: 10.1016/s0168-8278(02)00169-1.
38. Madeley, C.R. Letter: Viruses in infantile gastroenteritis / C.R. Madeley, B.P. Cosgrove // Lancet (London, England). – 1975. – Vol. 2. – № 7925. – P. 124. DOI: 10.1016/s0140-6736(75)90020-3.
39. Engvall, E. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G / E. Engvall, P. Perlmann // Immunochemistry. – 1971. – Vol. 8. – № 9. – P. 871-874. DOI: 10.1016/0019-2791(71)90454-x.
40. Тараканова, Ю.Н. Твердофазный иммуноферментный анализ: история, теория и практическое использование / Ю.Н. Тараканова, А.Д. Дмитриев, Д.А. Дмитриев [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. – Т. 96. – № 3. – С. 117-125.
41. Köhler, G. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity / G. Köhler, C. Milstein // Nature. – 1975. – Vol. 256. – № 5517. – P. 495-497. DOI: 10.1038/256495a0.
42. Houghton, M. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus / M. Houghton // Journal of Hepatology. – 2009. – Т. 51. – № 5. – P. 939-948. DOI: 10.1016/j.jhep.2009.08.004.

43. Hoogen, B.G. van den. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease / B.G. van den Hoogen, J.C. de Jong, J. Groen [et al.] // *Nature Medicine*. – 2001. – Vol. 7. – № 6. – P. 719-724. DOI: 10.1038/89098.
44. Pyrc, K. The novel human coronaviruses NL63 and HKU1 / K. Pyrc, B. Berkhout, L. van der Hoek // *Journal of Virology*. – 2007. – Vol. 81. – № 7. – P. 3051-3057. DOI: 10.1128/JVI.01466-06.
45. Allander, T. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples / T. Allander, M.T. Tammi, M. Eriksson [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2005. – Vol. 102. – № 36. – P. 12891-12896. DOI: 10.1073/pnas.0504666102.
46. Lamson, D. MassTag Polymerase-Chain-Reaction Detection of Respiratory Pathogens, Including a New Rhinovirus Genotype, That Caused Influenza-Like Illness in New York State during 2004–2005 / D. Lamson, N. Renwick, V. Kapoor [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2006. – Vol. 194. – № 10. – P. 1398-1402. DOI: 10.1086/508551.
47. Lau, SK. Human rhinovirus C: a newly discovered human rhinovirus species / Lau SK, Yip CC, Woo PC, Yuen K.-Y. // *Emerging Health Threats Journal*. – 2010. – Vol. 3. – P. e2. DOI: 10.3134/ehthj.10.002.
48. Babakir-Mina, M. The human polyomaviruses KI and WU: virological background and clinical implications / M. Babakir-Mina, M. Ciccozzi, C.F. Perno, M. Ciotti // *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. – 2013. – Vol. 121. – № 8. – P. 746-754. DOI: 10.1111/apm.12091.
49. Danna, K. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae* / K. Danna, D. Nathans // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1971. – Vol. 68. – № 12. – P. 2913-2917. DOI: 10.1073/pnas.68.12.2913.
50. Roberts, R.J. How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology / R.J. Roberts // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – Vol. 102. – № 17. – P. 5905-5908. DOI: 10.1073/pnas.0500923102.
51. Jackson, D.A. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli* / D.A. Jackson, R.H. Symons, P. Berg // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1972. – Vol. 69. – № 10. – P. 2904-2909. DOI: 10.1073/pnas.69.10.2904.
52. Sanger, F. Determination of nucleotide sequences in DNA / F. Sanger // *Science (New York, N.Y.)*. – 1981. – Vol. 214. – № 4526. – P. 1205-1210. DOI: 10.1126/science.7302589.

53. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1977. – Vol. 74. – № 12. – P. 5463-5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.
54. Sanger, F. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase / F. Sanger, A.R. Coulson // *Journal of Molecular Biology*. – 1975. – Vol. 94. – № 3. – P. 441-448. DOI: 10.1016/0022-2836(75)90213-2.
55. Southern, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis / E.M. Southern // *Journal of Molecular Biology*. – 1975. – Vol. 98. – № 3. – P. 503-517. DOI: 10.1016/S0022-2836(75)80083-0.
56. Alwine, J.C. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. / J.C. Alwine, D.J. Kemp, G.R. Stark // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1977. – Vol. 74. – № 12. – P. 5350-5354. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5350.
57. Saiki, R.K. Enzymatic Amplification of  $\beta$ -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia / R.K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona [et al.] // *Science*. – 1985. – Vol. 230. – № 4732. – P. 1350-1354. DOI: 10.1126/science.2999980.
58. Harsh. Medical viruses: diagnostic techniques / Harsh, P. Tripathi // *Virology Journal*. – 2023. – Vol. 20. – № 1. – P. 143. DOI: 10.1186/s12985-023-02108-w.
59. Quer, J. Next-Generation Sequencing for Confronting Virus Pandemics / J. Quer, S. Colomer-Castell, C. Campos [et al.] // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14. – № 3. – P. 600. DOI: 10.3390/v14030600.
60. Srivastava, P. Isothermal nucleic acid amplification and its uses in modern diagnostic technologies / P. Srivastava, D. Prasad // *3 Biotech*. – 2023. – Vol. 13. – № 6. – P. 200. DOI: 10.1007/s13205-023-03628-6.
61. Saad, A.A. Diagnostic accuracy of the Leishmania OligoC-TesT and NASBA-Oligochromatography for diagnosis of leishmaniasis in Sudan / A.A. Saad, N.G. Ahmed, O.S. Osman [et al.] // *PLoS neglected tropical diseases*. – 2010. – Vol. 4. – № 8. – P. e776. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000776.
62. Mourez, T. Comparison of the bioMérieux NucliSENS EasyQ HIV-1 v2.0-HIV-1 RNA quantification assay versus Abbott RealTime HIV-1 and Roche Cobas TaqMan HIV-1 v2.0 on current epidemic HIV-1 variants / T. Mourez, C. Delaugerre, M. Vray [et al.] // *Journal of Clinical Virology*. – 2015. – Vol. 71. – P. 76-81. DOI: 10.1016/j.jcv.2015.08.007.
63. Гущин, А.Е. Алгоритм лабораторного обследования пациентов на наличие инфекций, вызванных *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, методами полимеразно-цепной реакции и реакции транскрипционной амплификации /

А.Е. Гушин, П.Г. Рыжих, Г.А. Хайруллина, В.И. Кисина // Клиническая дерматология и венерология. – 2015. – Т. 14. – № 2. – С. 74-81.

64. Gaydos, C.A. Clinical performance of the Solana® Point-of-Care Trichomonas Assay from clinician-collected vaginal swabs and urine specimens from symptomatic and asymptomatic women / C.A. Gaydos, J. Schwebke, J. Dombrowski [et al.] // Expert Review of Molecular Diagnostics. – 2017. – Vol. 17. – № 3. – P. 303-306. DOI: 10.1080/14737159.2017.1282823.

65. Lemieux, B. Near instrument-free, simple molecular device for rapid detection of herpes simplex viruses / B. Lemieux, Y. Li, H. Kong, Y.-W. Tang // Expert Review of Molecular Diagnostics. – 2012. – Vol. 12. – № 5. – P. 437-443. DOI: 10.1586/erm.12.34.

66. Miller, N.S. Comparative clinical evaluation of the IsoAmp(®) HSV Assay with ELVIS(®) HSV culture/ID/typing test system for the detection of herpes simplex virus in genital and oral lesions / N.S. Miller, B. Yen-Lieberman, M.D. Poulter [et al.] // Journal of Clinical Virology. – 2012. – Vol. 54. – № 4. – P. 355-358. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.04.004.

67. Tong, Y. Multiple strategies to improve sensitivity, speed and robustness of isothermal nucleic acid amplification for rapid pathogen detection / Y. Tong, B. Lemieux, H. Kong // BMC biotechnology. – 2011. – Vol. 11. – P. 50. DOI: 10.1186/1472-6750-11-50.

68. Kurosaki, Y. Development and Evaluation of Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay Coupled with a Portable Device for Rapid Diagnosis of Ebola Virus Disease in Guinea / Y. Kurosaki, N. Magassouba, O.K. Oloniniyi [et al.] // PLoS neglected tropical diseases. – 2016. – Vol. 10. – № 2. – P. e0004472. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004472.

69. Notomi, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA / T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2000. – Vol. 28. – № 12. – P. E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.

70. Akduman, D. Evaluation of a strand displacement amplification assay (BD ProbeTec-SDA) for detection of Neisseria gonorrhoeae in urine specimens / D. Akduman, J.M. Ehret, K. Messina [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2002. – Vol. 40. – № 1. – P. 281-283. DOI: 10.1128/JCM.40.1.281-283.2002.

71. Kitamura, N. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA / N. Kitamura, B.L. Semler, P.G. Rothberg [et al.] // Nature. – 1981. – Vol. 291. – № 5816. – P. 547-553. DOI: 10.1038/291547a0.

72. Racaniello, V.R. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells / V.R. Racaniello, D. Baltimore // Science (New York, N.Y.). – 1981. – Vol. 214. – № 4523. – P. 916-919. DOI: 10.1126/science.6272391.

73. Stobart, C.C. RNA Virus Reverse Genetics and Vaccine Design / C.C. Stobart, M.L. Moore // *Viruses*. – 2014. – Vol. 6. – № 7. – P. 2531-2550. DOI: 10.3390/v6072531.

74. Martinez-Sobrido, L. Reverse genetics approaches for the development of new vaccines against influenza A virus infections / L. Martinez-Sobrido, M.L. DeDiego, A. Nogales // *Current opinion in virology*. – 2020. – Vol. 44. – P. 26-34. DOI: 10.1016/j.coviro.2020.06.001.

75. Perez, D. Reverse Genetics of RNA Viruses: Methods and Protocols, Second Edition. : Methods in Molecular Biology (MIMB, volume 2733) / D. Perez – Humana New York, NY, 2023.

76. Michel, M.-L. Hepatitis B vaccines: protective efficacy and therapeutic potential / M.-L. Michel, P. Tiollais // *Pathologie-Biologie*. – 2010. – Vol. 58. – Hepatitis B vaccines. – № 4. – P. 288-295. DOI: 10.1016/j.patbio.2010.01.006.

77. Kheirvari, M. Virus-like Particle Vaccines and Platforms for Vaccine Development / M. Kheirvari, H. Liu, E. Tumban // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15. – № 5. – P. 1109. DOI: 10.3390/v15051109.

78. Dolzhikova, I.V. Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous VSV- and Ad5-vectored Ebola vaccine: An open phase I/II trial in healthy adults in Russia / I.V. Dolzhikova, O.V. Zubkova, A.I. Tikhvatulin [et al.] // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2017. – Vol. 13. – Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous VSV- and Ad5-vectored Ebola vaccine. – № 3. – P. 613-620. DOI: 10.1080/21645515.2016.1238535.

79. Logunov, D.Y. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia / D.Y. Logunov, I.V. Dolzhikova, O.V. Zubkova [et al.] // *Lancet (London, England)*. – 2020. – Vol. 396. – Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations. – № 10255. – P. 887-897. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31866-3.

80. Baden, L.R. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine / L.R. Baden, H.M. El Sahly, B. Essink [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. 384. – № 5. – P. 403-416. DOI: 10.1056/NEJMoa2035389.

81. Walsh, E.E. Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates / E.E. Walsh, R.W. Frenck, A.R. Falsey [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383. – № 25. – P. 2439-2450. DOI: 10.1056/NEJMoa2027906.

82. Scott, L.J. Palivizumab / L.J. Scott, H.M. Lamb // *Drugs*. – 1999. – Vol. 58. – № 2. – P. 305-311; discussion 312-313. DOI: 10.2165/00003495-199958020-00009.

83. Wang, Y. Scalable live-attenuated SARS-CoV-2 vaccine candidate demonstrates preclinical safety and efficacy / Y. Wang, C. Yang, Y. Song [et al.] // *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America. – 2021. – Vol. 118. – № 29. – P. e2102775118. DOI: 10.1073/pnas.2102775118.

84. Yoshida, A. Versatile live-attenuated SARS-CoV-2 vaccine platform applicable to variants induces protective immunity / A. Yoshida, S. Okamura, S. Torii [et al.] // *iScience*. – 2022. – Vol. 25. – № 11. – P. 105412. DOI: 10.1016/j.isci.2022.105412.

85. David M. Knipe. *Fields Virology* / David M. Knipe, Peter M. Howley. – Sixth edition. – Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, 2007.

86. Villiers, E.-M. de. Classification of papillomaviruses / E.-M. de Villiers, C. Fauquet, T.R. Broker [et al.] // *Virology*. – 2004. – Vol. 324. – № 1. – P. 17-27. DOI: 10.1016/j.virol.2004.03.033.

87. International Human Papillomavirus Reference Center. – Mode of access: <https://www.hpvcenter.se/> (date of access: 18.10.2024). – [Electronic resource].

88. Bzhalava, D. International standardization and classification of human papillomavirus types / D. Bzhalava, C. Eklund, J. Dillner // *Virology*. – 2015. – Vol. 476. – P. 341-344. DOI: 10.1016/j.virol.2014.12.028.

89. Guan, P. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer / P. Guan, R. Howell-Jones, N. Li [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2012. – Vol. 131. – № 10. – P. 2349-2359. DOI: 10.1002/ijc.27485.

90. Arbyn, M. Are 20 human papillomavirus types causing cervical cancer? / M. Arbyn, M. Tommasino, C. Depuydt, J. Dillner // *The Journal of Pathology*. – 2014. – Vol. 234. – № 4. – P. 431-435. DOI: 10.1002/path.4424.

91. Poljak, M. Human papillomavirus prevalence and type-distribution, cervical cancer screening practices and current status of vaccination implementation in Central and Eastern Europe / M. Poljak, K. Seme, P.J. Maver [et al.] // *Vaccine*. – 2013. – Vol. 31 Suppl 7. – P. H59-70. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.03.029.

92. Yu, L. HPV16 and HPV18 Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation / L. Yu, V. Majerciak, Z.-M. Zheng // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 9. – P. 4943. DOI: 10.3390/ijms23094943.

93. Bodily, J. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression / J. Bodily, L.A. Laimins // *Trends in Microbiology*. – 2011. – Vol. 19. – № 1. – P. 33-39. DOI: 10.1016/j.tim.2010.10.002.

94. Harden, M.E. Human papillomavirus molecular biology / M.E. Harden, K. Munger // *Mutation Research. Reviews in Mutation Research*. – 2017. – Vol. 772. – P. 3-12. DOI: 10.1016/j.mrrev.2016.07.002.

95. Martel, C. de. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type / C. de Martel, M. Plummer, J. Vignat, S. Franceschi // *International Journal of Cancer*. – 2017. – Vol. 141. – № 4. – P. 664-670. DOI: 10.1002/ijc.30716.
96. Serrano, B. Epidemiology and burden of HPV-related disease / B. Serrano, M. Brotons, F.X. Bosch, L. Bruni // *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*. – 2018. – Vol. 47. – P. 14-26. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2017.08.006.
97. Chaturvedi, A.K. Beyond cervical cancer: burden of other HPV-related cancers among men and women / A.K. Chaturvedi // *The Journal of Adolescent Health: Official Publication of the Society for Adolescent Medicine*. – 2010. – Vol. 46. – № 4 Suppl. – P. S20-26. DOI: 10.1016/j.jadohealth.2010.01.016.
98. Grulich, A.E. Cancers attributable to human papillomavirus infection / A.E. Grulich, F. Jin, E.L. Conway [et al.] // *Sexual Health*. – 2010. – Vol. 7. – № 3. – P. 244-252. DOI: 10.1071/SH10020.
99. Баранов, А.А. Анализ экономического и социально-демографического бремени HPV-ассоциированных заболеваний и экономической эффективности вакцинации против HPV в России / А.А. Баранов, А.В. Плакида, Л.С. Намазова-Баранова [и др.] // *Педиатрическая фармакология*. – 2019. – Т. 16. – № 2. – С. 101-110. DOI: 10.15690/pf.v16i2.2007.
100. Perkins, R.B. Cervical Cancer Screening: A Review / R.B. Perkins, N. Wentzensen, R.S. Guido, M. Schiffman // *JAMA*. – 2023. – Vol. 330. – № 6. – P. 547-558. DOI: 10.1001/jama.2023.13174.
101. Schwarz, T.F. Clinical update of the AS04-adjuvanted human papillomavirus-16/18 cervical cancer vaccine, Cervarix / T.F. Schwarz // *Advances in Therapy*. – 2009. – Vol. 26. – № 11. – P. 983-998. DOI: 10.1007/s12325-009-0079-5.
102. Zhai, L. Gardasil-9: A global survey of projected efficacy / L. Zhai, E. Tumban // *Antiviral Research*. – 2016. – Vol. 130. – P. 101-109. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.03.016.
103. Human papillomavirus (HPV). – Mode of access: [https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/policies/position-papers/human-papillomavirus-\(hpv\)](https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/policies/position-papers/human-papillomavirus-(hpv)) (date of access: 25.10.2024). – [Electronic resource].
104. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper (2022 update). – WHO, 2022.
105. Ellingson, M.K. Human papillomavirus vaccine effectiveness by age at vaccination: A systematic review / M.K. Ellingson, H. Sheikh, K. Nyhan [et al.] // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2023. – Vol. 19. – № 2. – P. 2239085. DOI: 10.1080/21645515.2023.2239085.
106. Rogovskaya, S.I. Human papillomavirus prevalence and type-distribution, cervical cancer screening practices and current status of vaccination implementation in Russian Federation, the Western countries of the former Soviet Union, Caucasus region and Central Asia / S.I. Rogovskaya,

I.P. Shabalova, I.V. Mikheeva [et al.] // *Vaccine*. – 2013. – Vol. 31 Suppl 7. – P. H46-58. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.06.043.

107. Bell, M. Comparison between the Roche Cobas 4800 Human Papillomavirus (HPV), Abbott RealTime High-Risk HPV, Seegene Anyplex II HPV28, and Novel Seegene Allplex HPV28 Assays for High-Risk HPV Detection and Genotyping in Mocked Self-Samples / M. Bell, B. Verberckmoes, J. Devolder [et al.] // *Microbiology Spectrum*. – 2023. – Vol. 11. – № 4. – P. e0008123. DOI: 10.1128/spectrum.00081-23.

108. Heideman, D.A. Clinical validation of the cobas 4800 HPV test for cervical screening purposes / D.A. M. Heideman, A.T. Hesselink, J. Berkhof [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2011. – Vol. 49. – № 11. – P. 3983-3985. DOI: 10.1128/JCM.05552-11.

109. Lee, D.-H. Comparison of the performance of Anyplex II HPV HR, the Cobas 4800 human papillomavirus test and Hybrid Capture 2 / D.-H. Lee, N.R. Hwang, M.C. Lim [et al.] // *Annals of Clinical Biochemistry*. – 2016. – Vol. 53. – № Pt 5. – P. 561-567. DOI: 10.1177/0004563215614036.

110. Ki, E.Y. Comparison of the Cobas 4800 HPV test and the Seeplex HPV4A ACE with the hybrid capture 2 test / E.Y. Ki, H.E. Kim, Y.-J. Choi [et al.] // *International Journal of Medical Sciences*. – 2013. – Vol. 10. – № 2. – P. 119-123. DOI: 10.7150/ijms.5460.

111. Интерлабсервис. – Режим доступа: <https://interlabservice.ru/> (дата обращения: 18.10.2024). – [Электронный ресурс].

112. Донников, А.Е. Анализ распространенности и вирусной нагрузки различных типов вируса папилломы человека в регионах Российской Федерации. : *Акушерство и гинекология* / А.Е. Донников, М.И. Маркелов, Т.Ю. Пестрикова [и др.]. – Т. 4. – С. 39-47.

113. Файзулов, Е.Б. / Распространенность папилломавирусов человека высокого и низкого онкогенного риска на территории Российской Федерации / Е.Б. Файзулов, А.Н. Каира, Т.Р. Узбеков, А.А. Поромов, Е.А. Волынская, О.А. Свитич, В.В. Зверев // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. – 2021. – Т. 39. – № 4. – P. 39-47. DOI: 10.17116/molgen20213904139.

114. Tekkesin, N. Analysis of the Prevalence and Quantification of viral load of different human papillomavirus types in Turkish women population / N. Tekkesin, S. Goktas, V. Alkis [et al.] // *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. – 2022. – Vol. 23. – № 12. – P. 4347-4355. DOI: 10.31557/APJCP.2022.23.12.4347.

115. Andersen, K. Targeted Next Generation Sequencing for Human Papillomavirus Genotyping in Cervical Liquid-Based Cytology Samples / K. Andersen, K. Holm, M. Tranberg [et al.] // *Cancers*. – 2022. – Vol. 14. – № 3. – P. 652. DOI: 10.3390/cancers14030652.



116. Ardhaoui, M. Nested PCR followed by NGS: Validation and application for HPV genotyping of Tunisian cervical samples / M. Ardhaoui, E. Ennaifer, A.C. De Matos Salim [et al.] // *PloS One*. – 2021. – Vol. 16. – № 8. – P. e0255914. DOI: 10.1371/journal.pone.0255914.
117. Basiletti, J.A. Human papillomavirus genotyping using next generation sequencing (NGS) in cervical lesions: Genotypes by histologic grade and their relative proportion in multiple infections / J.A. Basiletti, J. Valls, T. Poklépovich [et al.] // *PloS One*. – 2022. – Vol. 17. – № 11. – P. e0278117. DOI: 10.1371/journal.pone.0278117.
118. Jitvaropas, R. Development of a simplified and cost-effective sample preparation method for genotyping of human papillomavirus by next-generation sequencing / R. Jitvaropas, U. Thongpoom, V. Sawaswong [et al.] // *Archives of Virology*. – 2023. – Vol. 168. – № 7. – P. 185. DOI: 10.1007/s00705-023-05810-w.
119. Lilja-Fischer, J.K. HPV testing versus p16 immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinoma: results from the DAHANCA 19 study / J.K. Lilja-Fischer, M.H. Kristensen, P. Lassen [et al.] // *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)*. – 2023. – P. 1-5. DOI: 10.1080/0284186X.2023.2266127.
120. Chan, W.S. An economical Nanopore sequencing assay for human papillomavirus (HPV) genotyping / W.S. Chan, T.L. Chan, C.H. Au [et al.] // *Diagnostic Pathology*. – 2020. – Vol. 15. – № 1. – P. 45. DOI: 10.1186/s13000-020-00964-6.
121. Brancaccio, R.N. MinION nanopore sequencing and assembly of a complete human papillomavirus genome / R.N. Brancaccio, A. Robitaille, S. Dutta [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2021. – Vol. 294. – P. 114180. DOI: 10.1016/j.jviromet.2021.114180.
122. Yang, S. Whole Genome Assembly of Human Papillomavirus by Nanopore Long-Read Sequencing / S. Yang, Q. Zhao, L. Tang [et al.] // *Frontiers in Genetics*. – 2021. – Vol. 12. – P. 798608. DOI: 10.3389/fgene.2021.798608.
123. Vetter, V. Established and new rotavirus vaccines: a comprehensive review for healthcare professionals / V. Vetter, R.C. Gardner, S. Debrus [et al.] // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2022. – Vol. 18. – № 1. – P. 1870395. DOI: 10.1080/21645515.2020.1870395.
124. Patton, J.T. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world / J.T. Patton // *Discovery Medicine*. – 2012. – Vol. 13. – № 68. – P. 85-97.
125. Afrad, M.H. High incidence of reassortant G9P[4] rotavirus strain in Bangladesh: fully heterotypic from vaccine strains / M.H. Afrad, M.Z. Rahman, J. Matthijnsens [et al.] // *Journal of Clinical Virology*. – 2013. – Vol. 58. – № 4. – P. 755-756. DOI: 10.1016/j.jcv.2013.09.024.
126. Dóró, R. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: is there evidence of strain selection from vaccine pressure? / R. Dóró, B. László,

V. Martella [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2014. – Vol. 28. – P. 446-461. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.08.017.

127. Leshem, E. Distribution of rotavirus strains and strain-specific effectiveness of the rotavirus vaccine after its introduction: a systematic review and meta-analysis / E. Leshem, B. Lopman, R. Glass [et al.] // *The Lancet. Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 14. – № 9. – P. 847-856. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70832-1.

128. Velasquez, D.E. Strain diversity plays no major role in the varying efficacy of rotavirus vaccines: an overview / D.E. Velasquez, U.D. Parashar, B. Jiang // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2014. – Vol. 28. – P. 561-571. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.10.008.

129. Esona, M.D. Rotavirus : Diagnostic Testing for Enteric Pathogens / M.D. Esona, R. Gautam // *Clinics in Laboratory Medicine*. – 2015. – Vol. 35. – № 2. – P. 363-391. DOI: 10.1016/j.cll.2015.02.012.

130. Freeman, M.M. Enhancement of detection and quantification of rotavirus in stool using a modified real-time RT-PCR assay / M.M. Freeman, T. Kerin, J. Hull [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2008. – Vol. 80. – № 8. – P. 1489-1496. DOI: 10.1002/jmv.21228.

131. Gómara, M.I. Methods of rotavirus detection, sero- and genotyping, sequencing, and phylogenetic analysis / M.I. Gómara, J. Green, J. Gray // *Methods in Molecular Medicine*. – 2000. – Vol. 34. – P. 189-216. DOI: 10.1385/1-59259-078-0:189.

132. Gentsch, J.R. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction / J.R. Gentsch, R.I. Glass, P. Woods [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1992. – Vol. 30. – № 6. – P. 1365-1373. DOI: 10.1128/jcm.30.6.1365-1373.1992.

133. Gouvea, V. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens / V. Gouvea, R.I. Glass, P. Woods [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1990. – Vol. 28. – № 2. – P. 276-282. DOI: 10.1128/jcm.28.2.276-282.1990.

134. Manual of rotavirus detection and characterization methods. – Geneva, Switzerland : WHO, 2009. – 146 c.

135. Kiseleva, V. Molecular-Genetic Characterization of Human Rotavirus A Strains Circulating in Moscow, Russia (2009–2014) / V. Kiseleva, E. Faizuloev, E. Meskina, A. Marova, A. Oksanich, T. Samartseva, G. Bakhtoyarov, N. Bochkareva, N. Filatov, Linok A., Y. Ammour, V. Zverev // *Virologica Sinica*. – 2018. – Vol. 33. – № 4. – P. 304-313. DOI: 10.1007/s12250-018-0043-0.

136. Kottaridi, C. Evaluation of a multiplex real time reverse transcription PCR assay for the detection and quantitation of the most common human rotavirus genotypes / C. Kottaridi, A.T. Spathis, C.K. Ntova [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2012. – Vol. 180. – № 1-2. – P. 49-53. DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.12.009.

137. Liu, J. Molecular genotyping and quantitation assay for rotavirus surveillance / J. Liu, K. Lurain, S.U. Sobuz [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2015. – Vol. 213. – P. 157-163. DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.12.001.
138. Mousavi-Nasab, S.D. A Real-Time RT-PCR Assay for Genotyping of Rotavirus / S.D. Mousavi-Nasab, F. Sabahi, H. Kaghazian [et al.] // *Iranian Biomedical Journal*. – 2020. – Vol. 24. – № 6. – P. 399-404. DOI: 10.29252/ibj.24.6.394.
139. Podkolzin, A.T. Hospital-based surveillance of rotavirus and other viral agents of diarrhea in children and adults in Russia, 2005-2007 / A.T. Podkolzin, E.B. Fenske, N.Y. Abramycheva [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2009. – Vol. 200 Suppl 1. – P. S228-233. DOI: 10.1086/605054.
140. Matthijnssens, J. Uniformity of Rotavirus Strain Nomenclature Proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG) / J. Matthijnssens, M. Ciarlet, S.M. McDonald [et al.] // *Archives of Virology*. – 2011. – Vol. 156. – № 8. – P. 1397-1413. DOI: 10.1007/s00705-011-1006-z.
141. Matthijnssens, J. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments / J. Matthijnssens, M. Ciarlet, M. Rahman [et al.] // *Archives of Virology*. – 2008. – Vol. 153. – № 8. – P. 1621-1629. DOI: 10.1007/s00705-008-0155-1.
142. Maes, P. RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses / P. Maes, J. Matthijnssens, M. Rahman, M. Van Ranst // *BMC microbiology*. – 2009. – Vol. 9. – RotaC. – P. 238. DOI: 10.1186/1471-2180-9-238.
143. Conceição-Neto, N. Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: a reproducible protocol for virome analysis / N. Conceição-Neto, M. Zeller, H. Lefrère [et al.] // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – № 1. – P. 16532. DOI: 10.1038/srep16532.
144. Simsek, C. Rotavirus vaccine-derived cases in Belgium: Evidence for reversion of attenuating mutations and alternative causes of gastroenteritis / C. Simsek, M. Bloemen, D. Jansen [et al.] // *Vaccine*. – 2022. – Vol. 40. – № 35. – P. 5114-5125. DOI: 10.1016/j.vaccine.2022.06.082.
145. Portal, T.M. Molecular characterization of the gastrointestinal eukaryotic virome in elderly people in Belem, Para, Brazil / T.M. Portal, B. Vanmechelen, L. Van Espen [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2022. – Vol. 99. – P. 105241. DOI: 10.1016/j.meegid.2022.105241.
146. Lagan, P. Genome analyses of species A rotavirus isolated from various mammalian hosts in Northern Ireland during 2013-2016 / P. Lagan, M.H. Mooney, K. Lemon // *Virus Evolution*. – 2023. – Vol. 9. – № 2. – P. vead039. DOI: 10.1093/ve/vead039.
147. Schmitz, D. Metagenomic Surveillance of Viral Gastroenteritis in a Public Health Setting / D. Schmitz, F. Zwagemaker, B. van der Veer [et al.] // *Microbiology Spectrum*. – 2023. – Vol. 11. – № 4. – P. e0502222. DOI: 10.1128/spectrum.05022-22.

148. Simsek, C. High Prevalence of Coinfecting Enteropathogens in Suspected Rotavirus Vaccine Breakthrough Cases / C. Simsek, M. Bloemen, D. Jansen [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2021. – Vol. 59. – № 12. – P. e0123621. DOI: 10.1128/JCM.01236-21.

149. Yamani, L.N. Complete genome analyses of G12P[8] rotavirus strains from hospitalized children in Surabaya, Indonesia, 2017-2018 / L.N. Yamani, T. Utsumi, Y.H. Doan [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2023. – Vol. 95. – № 2. – P. e28485. DOI: 10.1002/jmv.28485.

150. Kim, J.-H. Detection of an unusual G8P[8] rotavirus in a Rotarix-vaccinated child with acute gastroenteritis using Nanopore MinION sequencing: A case report / J.-H. Kim, D.Y. Yi, I. Lim [et al.] // *Medicine*. – 2020. – Vol. 99. – № 40. – P. e22641. DOI: 10.1097/MD.00000000000022641.

151. Yandle, Z. A viral metagenomic protocol for nanopore sequencing of group A rotavirus / Z. Yandle, G. Gonzalez, M. Carr [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2023. – Vol. 312. – P. 114664. DOI: 10.1016/j.jviromet.2022.114664.

152. Faizuloev, E. New approach of genetic characterization of group A rotaviruses by the nanopore sequencing method / E. Faizuloev, R. Mintaev, O. Petrusha, A. Marova, D. Smirnova, Y. Ammour, E. Meskina, O. Sergeev, S. Zhavoronok, A. Karaulov, O. Svitich, V. Zverev // *Journal of Virological Methods*. – 2021. – Vol. 292. – P. 114114. DOI: 10.1016/j.jviromet.2021.114114.

153. Wang, S. Molecular evolutionary characteristics of SARS-CoV-2 emerging in the United States / S. Wang, X. Xu, C. Wei [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2022. – Vol. 94. – № 1. – P. 310-317. DOI: 10.1002/jmv.27331.

154. Berno, G. SARS-CoV-2 Variants Identification: Overview of Molecular Existing Methods / G. Berno, L. Fabeni, G. Matusali [et al.] // *Pathogens (Basel, Switzerland)*. – 2022. – Vol. 11. – № 9. – P. 1058. DOI: 10.3390/pathogens11091058.

155. Gribble, J. The coronavirus proofreading exoribonuclease mediates extensive viral recombination / J. Gribble, L.J. Stevens, M.L. Agostini [et al.] // *PLoS pathogens*. – 2021. – Vol. 17. – № 1. – P. e1009226. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009226.

156. Shu, Y. GISAID: Global initiative on sharing all influenza data - from vision to reality / Y. Shu, J. McCauley // *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*. – 2017. – Vol. 22. – № 13. – P. 30494. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.13.30494.

157. Li, X. Transmission dynamics and evolutionary history of 2019-nCoV / X. Li, W. Wang, X. Zhao [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2020. – Vol. 92. – № 5. – P. 501-511. DOI: 10.1002/jmv.25701.

158. GISAID. – re3data.org - Registry of Research Data Repositories, 2012. – Mode of access: <https://www.re3data.org/repository/r3d100010126> (date of access: 18.10.2024). – [Electronic resource].

159. Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health. – Mode of access: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240018440> (date of access: 17.10.2023). – [Electronic resource].
160. Singh, D.D. SARS-CoV-2: Recent Variants and Clinical Efficacy of Antibody-Based Therapy / D.D. Singh, A. Sharma, H.-J. Lee, D.K. Yadav // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2022. – Vol. 12. – P. 839170. DOI: 10.3389/fcimb.2022.839170.
161. European Centre for Disease Prevention and Control. Guidance for representative and targeted genomic SARS-CoV-2 monitoring. – ECDC: Stockholm, 2021.
162. Duerr, R. Delta-Omicron recombinant escapes therapeutic antibody neutralization / R. Duerr, H. Zhou, T. Tada [et al.] // *iScience*. – 2023. – Vol. 26. – № 2. – P. 106075. DOI: 10.1016/j.isci.2023.106075.
163. Karamitros, T. SARS-CoV-2 exhibits intra-host genomic plasticity and low-frequency polymorphic quasispecies / T. Karamitros, G. Papadopoulou, M. Bousali [et al.] // *Journal of Clinical Virology*. – 2020. – Vol. 131. – P. 104585. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104585.
164. Martínez-Chinchilla, C. Persistence of SARS-CoV-2 Infection in Severely Immunocompromised Patients With Complete Remission B-Cell Lymphoma and Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy: A Case Report of Two Cases / C. Martínez-Chinchilla, L. Vazquez-Montero, N. Palazón-Carrión [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 860891. DOI: 10.3389/fimmu.2022.860891.
165. Rueca, M. Compartmentalized Replication of SARS-Cov-2 in Upper vs. Lower Respiratory Tract Assessed by Whole Genome Quasispecies Analysis / M. Rueca, B. Bartolini, C.E.M. Gruber [et al.] // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8. – № 9. – P. 1302. DOI: 10.3390/microorganisms8091302.
166. Van der Moeren, N. Viral Evolution and Immunology of SARS-CoV-2 in a Persistent Infection after Treatment with Rituximab / N. Van der Moeren, P. Selhorst, M. Ha [et al.] // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14. – № 4. – P. 752. DOI: 10.3390/v14040752.
167. Wu, F. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China / F. Wu, S. Zhao, B. Yu [et al.] // *Nature*. – 2020. – Vol. 579. – № 7798. – P. 265-269. DOI: 10.1038/s41586-020-2008-3.
168. Fomsgaard, A.S. Improvements in metagenomic virus detection by simple pretreatment methods / A.S. Fomsgaard, M. Rasmussen, K. Spiess [et al.] // *Journal of Clinical Virology Plus*. – 2022. – Vol. 2. – № 4. – P. 100120. DOI: 10.1016/j.jcvp.2022.100120.
169. Reyes, G.R. Sequence-independent, single-primer amplification (SISPA) of complex DNA populations / G.R. Reyes, J.P. Kim // *Molecular and Cellular Probes*. – 1991. – Vol. 5. – № 6. – P. 473-481. DOI: 10.1016/s0890-8508(05)80020-9.

170. Capobianchi, M.R. Molecular characterization of SARS-CoV-2 from the first case of COVID-19 in Italy / M.R. Capobianchi, M. Rueca, F. Messina [et al.] // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2020. – Vol. 26. – № 7. – P. 954-956. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.03.025.
171. Artic Network. – Режим доступа: <https://artic.network/> (дата обращения: 18.10.2024). – [Электронный ресурс].
172. Lambisia, A.W. Optimization of the SARS-CoV-2 ARTIC Network V4 Primers and Whole Genome Sequencing Protocol / A.W. Lambisia, K.S. Mohammed, T.O. Makori [et al.] // *Frontiers in Medicine*. – 2022. – Vol. 9. – P. 836728. DOI: 10.3389/fmed.2022.836728.
173. Tshiabuila, D. Comparison of SARS-CoV-2 sequencing using the ONT GridION and the Illumina MiSeq / D. Tshiabuila, J. Giandhari, S. Pillay [et al.] // *BMC genomics*. – 2022. – Vol. 23. – № 1. – P. 319. DOI: 10.1186/s12864-022-08541-5.
174. Fissel, J.A. Implementation of a Streamlined SARS-CoV-2 Whole-Genome Sequencing Assay for Expeditious Surveillance during the Emergence of the Omicron Variant / J.A. Fissel, J. Mestas, P.Y. Chen [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2022. – Vol. 60. – № 4. – P. e0256921. DOI: 10.1128/jcm.02569-21.
175. Plitnick, J. Whole-Genome Sequencing of SARS-CoV-2: Assessment of the Ion Torrent AmpliSeq Panel and Comparison with the Illumina MiSeq ARTIC Protocol / J. Plitnick, S. Griesemer, E. Lasek-Nesselquist [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2021. – Vol. 59. – № 12. – P. e0064921. DOI: 10.1128/JCM.00649-21.
176. Brandt, C. poreCov-An Easy to Use, Fast, and Robust Workflow for SARS-CoV-2 Genome Reconstruction via Nanopore Sequencing / C. Brandt, S. Krautwurst, R. Spott [et al.] // *Frontiers in Genetics*. – 2021. – Vol. 12. – P. 711437. DOI: 10.3389/fgene.2021.711437.
177. DRAGEN Secondary Analysis | Variant calling and genomics software. – Режим доступа: <https://emea.illumina.com/products/by-type/informatics-products/dragen-secondary-analysis.html#dragen> (дата обращения: 17.10.2023). – [Электронный ресурс].
178. Jacot, D. Assessment of SARS-CoV-2 Genome Sequencing: Quality Criteria and Low-Frequency Variants / D. Jacot, T. Pillonel, G. Greub, C. Bertelli // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2021. – Vol. 59. – № 10. – P. e0094421. DOI: 10.1128/JCM.00944-21.
179. Shepard, S.S. Viral deep sequencing needs an adaptive approach: IRMA, the iterative refinement meta-assembler / S.S. Shepard, S. Meno, J. Bahl [et al.] // *BMC genomics*. – 2016. – Vol. 17. – № 1. – P. 708. DOI: 10.1186/s12864-016-3030-6.
180. Tilloy, V. ASPICov: An automated pipeline for identification of SARS-Cov2 nucleotidic variants / V. Tilloy, P. Cuzin, L. Leroi [et al.] // *PloS One*. – 2022. – Vol. 17. – № 1. – P. e0262953. DOI: 10.1371/journal.pone.0262953.

181. Aksamentov, I. Nextclade: clade assignment, mutation calling and quality control for viral genomes / I. Aksamentov, C. Roemer, E.B. Hodcroft, R.A. Neher // *Journal of Open Source Software*. – 2021. – Vol. 6. – № 67. – P. 3773. DOI: 10.21105/joss.03773.
182. O’Toole, Á. Assignment of epidemiological lineages in an emerging pandemic using the pangolin tool / Á. O’Toole, E. Scher, A. Underwood [et al.] // *Virus Evolution*. – 2021. – Vol. 7. – № 2. – P. veab064. DOI: 10.1093/ve/veab064.
183. Year-letter Genetic Clade Naming for SARS-CoV-2 on Nextstrain.org. – Mode of access: <https://nextstrain.org/blog/2020-06-02-SARSCoV2-clade-naming> (date of access: 01.02.2023). – [Electronic resource].
184. Cov-Lineages. – Режим доступа: <https://cov-lineages.org/resources/pangolin.html> (дата обращения: 02.02.2023). – [Электронный ресурс].
185. Salles, T.S. Genomic surveillance of SARS-CoV-2 Spike gene by sanger sequencing / T.S. Salles, A.C. Cavalcanti, F.B. da Costa [et al.] // *PloS One*. – 2022. – Vol. 17. – № 1. – P. e0262170. DOI: 10.1371/journal.pone.0262170.
186. Liu, Y.-C. COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history / Y.-C. Liu, R.-L. Kuo, S.-R. Shih // *Biomedical Journal*. – 2020. – Vol. 43. – № 4. – P. 328-333. DOI: 10.1016/j.bj.2020.04.007.
187. COVID-19 Map. – Mode of access: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html> (date of access: 18.10.2024). – [Electronic resource].
188. Никонова, А.А. Генетическое разнообразие и эволюция биологических свойств коронавируса SARS-CoV-2 в условиях глобального распространения / А.А. Никонова, Е.Б. Файзулов, А.В. Грачева, Ю.И. Исаков, В.В. Зверев // *Acta Naturae*. – 2021. – Т. 13. – № 3. – P. 77-89. DOI: 10.32607/actanaturae.11337.
189. Geoghegan, J.L. The phylogenomics of evolving virus virulence / J.L. Geoghegan, E.C. Holmes // *Nature Reviews. Genetics*. – 2018. – Vol. 19. – № 12. – P. 756-769. DOI: 10.1038/s41576-018-0055-5.
190. Nakagawa, S. Genome evolution of SARS-CoV-2 and its virological characteristics / S. Nakagawa, T. Miyazawa // *Inflammation and Regeneration*. – 2020. – Vol. 40. – P. 17. DOI: 10.1186/s41232-020-00126-7.
191. Zhou, H. A Novel Bat Coronavirus Closely Related to SARS-CoV-2 Contains Natural Insertions at the S1/S2 Cleavage Site of the Spike Protein / H. Zhou, X. Chen, T. Hu [et al.] // *Current biology: CB*. – 2020. – Vol. 30. – № 11. – P. 2196-2203.e3. DOI: 10.1016/j.cub.2020.05.023.
192. Zhou, P. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin / P. Zhou, X.-L. Yang, X.-G. Wang [et al.] // *Nature*. – 2020. – Vol. 579. – № 7798. – P. 270-273. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.

193. Guo, Y.-R. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status / Y.-R. Guo, Q.-D. Cao, Z.-S. Hong [et al.] // *Military Medical Research*. – 2020. – Vol. 7. – № 1. – P. 11. DOI: 10.1186/s40779-020-00240-0.
194. Yuan, S. Analysis of Possible Intermediate Hosts of the New Coronavirus SARS-CoV-2 / S. Yuan, S.-C. Jiang, Z.-L. Li // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2020. – Vol. 7. – P. 379. DOI: 10.3389/fvets.2020.00379.
195. Lam, T.T.-Y. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins / T.T.-Y. Lam, N. Jia, Y.-W. Zhang [et al.] // *Nature*. – 2020. – Vol. 583. – № 7815. – P. 282-285. DOI: 10.1038/s41586-020-2169-0.
196. Wu, C. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods / C. Wu, Y. Liu, Y. Yang [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica. B*. – 2020. – Vol. 10. – № 5. – P. 766-788. DOI: 10.1016/j.apsb.2020.02.008.
197. Chen, Y. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis / Y. Chen, Q. Liu, D. Guo // *Journal of Medical Virology*. – 2020. – Vol. 92. – № 4. – P. 418-423. DOI: 10.1002/jmv.25681.
198. Li, X. Emergence of SARS-CoV-2 through recombination and strong purifying selection / X. Li, E.E. Giorgi, M.H. Marichannelgowda [et al.] // *Science Advances*. – 2020. – Vol. 6. – № 27. – P. eabb9153. DOI: 10.1126/sciadv.abb9153.
199. Liu, C. The Architecture of Inactivated SARS-CoV-2 with Postfusion Spikes Revealed by Cryo-EM and Cryo-ET / C. Liu, L. Mendonza, Y. Yang [et al.] // *Structure (London, England: 1993)*. – 2020. – Vol. 28. – № 11. – P. 1218-1224.e4. DOI: 10.1016/j.str.2020.10.001.
200. Zhu, N. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 / N. Zhu, D. Zhang, W. Wang [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 382. – № 8. – P. 727-733. DOI: 10.1056/NEJMoa2001017.
201. Bai, C. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins / C. Bai, Q. Zhong, G.F. Gao // *Science China. Life Sciences*. – 2022. – Vol. 65. – № 2. – P. 280-294. DOI: 10.1007/s11427-021-1964-4.
202. Lim, Y.X. Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions / Y.X. Lim, Y.L. Ng, J.P. Tam, D.X. Liu // *Diseases (Basel, Switzerland)*. – 2016. – Vol. 4. – № 3. – P. 26. DOI: 10.3390/diseases4030026.
203. Nelson, C.W. Dynamically evolving novel overlapping gene as a factor in the SARS-CoV-2 pandemic / C.W. Nelson, Z. Arden, T.L. Goldberg [et al.] // *eLife*. – 2020. – Vol. 9. – P. e59633. DOI: 10.7554/eLife.59633.
204. Davidson, A.M. Interaction of SARS-CoV-2 and Other Coronavirus With ACE (Angiotensin-Converting Enzyme)-2 as Their Main Receptor: Therapeutic Implications / A.M.



Davidson, J. Wysocki, D. Battle // *Hypertension* (Dallas, Tex.: 1979). – 2020. – Vol. 76. – № 5. – P. 1339-1349. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15256.

205. Walls, A.C. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein / A.C. Walls, Y.-J. Park, M.A. Tortorici [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 181. – № 2. – P. 281-292.e6. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.058.

206. Shang, J. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2 / J. Shang, G. Ye, K. Shi [et al.] // *Nature*. – 2020. – Vol. 581. – № 7807. – P. 221-224. DOI: 10.1038/s41586-020-2179-y.

207. Bestle, D. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells / D. Bestle, M.R. Heindl, H. Limburg [et al.] // *Life Science Alliance*. – 2020. – Vol. 3. – № 9. – P. e202000786. DOI: 10.26508/lsa.202000786.

208. Hoffmann, M. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor / M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 181. – № 2. – P. 271-280.e8. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052.

209. Tang, T. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development / T. Tang, M. Bidon, J.A. Jaimes [et al.] // *Antiviral Research*. – 2020. – Vol. 178. – P. 104792. DOI: 10.1016/j.antiviral.2020.104792.

210. Ruch, T.R. The coronavirus E protein: assembly and beyond / T.R. Ruch, C.E. Machamer // *Viruses*. – 2012. – Vol. 4. – № 3. – P. 363-382. DOI: 10.3390/v4030363.

211. Neuman, B.W. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology / B.W. Neuman, G. Kiss, A.H. Kunding [et al.] // *Journal of Structural Biology*. – 2011. – Vol. 174. – № 1. – P. 11-22. DOI: 10.1016/j.jsb.2010.11.021.

212. McBride, R. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein / R. McBride, M. van Zyl, B.C. Fielding // *Viruses*. – 2014. – Vol. 6. – № 8. – P. 2991-3018. DOI: 10.3390/v6082991.

213. Sungnak, W. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes / W. Sungnak, N. Huang, C. Вйcavin [et al.] // *Nature Medicine*. – 2020. – Vol. 26. – № 5. – P. 681-687. DOI: 10.1038/s41591-020-0868-6.

214. Khan, F.A. The role of selectivity of the SARS-CoV-2 virus for human genetic profiles in susceptibility and resistance to COVID-19 / F.A. Khan // *New Microbes and New Infections*. – 2020. – Vol. 36. – P. 100697. DOI: 10.1016/j.nmni.2020.100697.

215. Liu, K. Clinical characteristics of novel coronavirus cases in tertiary hospitals in Hubei Province / K. Liu, Y.-Y. Fang, Y. Deng [et al.] // *Chinese Medical Journal*. – 2020. – Vol. 133. – № 9. – P. 1025-1031. DOI: 10.1097/CM9.0000000000000744.

216. Russell, C.D. Clinical evidence does not support corticosteroid treatment for 2019-nCoV lung injury / C.D. Russell, J.E. Millar, J.K. Baillie // *Lancet* (London, England). – 2020. – Vol. 395. – № 10223. – P. 473-475. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30317-2.

217. Yang, X. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study / X. Yang, Y. Yu, J. Xu [et al.] // *The Lancet. Respiratory Medicine*. – 2020. – Vol. 8. – № 5. – P. 475-481. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30079-5.
218. Oran, D.P. Prevalence of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection : A Narrative Review / D.P. Oran, E.J. Topol // *Annals of Internal Medicine*. – 2020. – Vol. 173. – № 5. – P. 362-367. DOI: 10.7326/M20-3012.
219. Abduljalil, J.M. Epidemiology, genome, and clinical features of the pandemic SARS-CoV-2: a recent view / J.M. Abduljalil, B.M. Abduljalil // *New Microbes and New Infections*. – 2020. – Vol. 35. – P. 100672. DOI: 10.1016/j.nmni.2020.100672.
220. Wu, Z. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention / Z. Wu, J.M. McGoogan // *JAMA*. – 2020. – Vol. 323. – № 13. – P. 1239-1242. DOI: 10.1001/jama.2020.2648.
221. Harrison, S.L. Comorbidities associated with mortality in 31,461 adults with COVID-19 in the United States: A federated electronic medical record analysis / S.L. Harrison, E. Fazio-Eynullayeva, D.A. Lane [et al.] // *PLoS medicine*. – 2020. – Vol. 17. – № 9. – P. e1003321. DOI: 10.1371/journal.pmed.1003321.
222. Petrilli, C.M. Factors associated with hospital admission and critical illness among 5279 people with coronavirus disease 2019 in New York City: prospective cohort study / C.M. Petrilli, S.A. Jones, J. Yang [et al.] // *BMJ (Clinical research ed.)*. – 2020. – Vol. 369. – P. m1966. DOI: 10.1136/bmj.m1966.
223. Richardson, S. Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area / S. Richardson, J.S. Hirsch, M. Narasimhan [et al.] // *JAMA*. – 2020. – Vol. 323. – № 20. – P. 2052-2059. DOI: 10.1001/jama.2020.6775.
224. Wang, D. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China / D. Wang, B. Hu, C. Hu [et al.] // *JAMA*. – 2020. – Vol. 323. – № 11. – P. 1061-1069. DOI: 10.1001/jama.2020.1585.
225. Zhang, Y. Coagulopathy and Antiphospholipid Antibodies in Patients with Covid-19 / Y. Zhang, M. Xiao, S. Zhang [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 382. – № 17. – P. e38. DOI: 10.1056/NEJMc2007575.
226. Mehta, P. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression / P. Mehta, D.F. McAuley, M. Brown [et al.] // *Lancet (London, England)*. – 2020. – Vol. 395. – № 10229. – P. 1033-1034. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30628-0.

227. Rawson, T.M. Bacterial and Fungal Coinfection in Individuals With Coronavirus: A Rapid Review To Support COVID-19 Antimicrobial Prescribing / T.M. Rawson, L.S.P. Moore, N. Zhu [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 71. – № 9. – P. 2459-2468. DOI: 10.1093/cid/ciaa530.

228. Ludvigsson, J.F. Systematic review of COVID-19 in children shows milder cases and a better prognosis than adults / J.F. Ludvigsson // *Acta Paediatrica* (Oslo, Norway: 1992). – 2020. – Vol. 109. – № 6. – P. 1088-1095. DOI: 10.1111/apa.15270.

229. Мескина, Е.Р. Предварительный клинико-эпидемиологический анализ первых 1000 случаев COVID-19 у детей в Московской области / Е.Р. Мескина // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2020. – Т. 97. – № 3. – С. 202-213.

230. Ahmed, M. Multisystem inflammatory syndrome in children: A systematic review / M. Ahmed, S. Advani, A. Moreira [et al.] // *EClinicalMedicine*. – 2020. – Vol. 26. – P. 100527. DOI: 10.1016/j.eclinm.2020.100527.

231. Fujikura, K. Genetic variations in the human severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor ACE2 and serine protease TMPRSS2 / K. Fujikura, K. Uesaka // *Journal of Clinical Pathology*. – 2021. – Vol. 74. – № 5. – P. 307-313. DOI: 10.1136/jclinpath-2020-206867.

232. Hamming, I. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis / I. Hamming, W. Timens, M.L.C. Bulthuis [et al.] // *The Journal of Pathology*. – 2004. – Vol. 203. – № 2. – P. 631-637. DOI: 10.1002/path.1570.

233. LoPresti, M. The Role of Host Genetic Factors in Coronavirus Susceptibility: Review of Animal and Systematic Review of Human Literature / M. LoPresti, D.B. Beck, P. Duggal [et al.] // *American Journal of Human Genetics*. – 2020. – Vol. 107. – № 3. – P. 381-402. DOI: 10.1016/j.ajhg.2020.08.007.

234. Hou, Y. New insights into genetic susceptibility of COVID-19: an ACE2 and TMPRSS2 polymorphism analysis / Y. Hou, J. Zhao, W. Martin [et al.] // *BMC medicine*. – 2020. – Vol. 18. – № 1. – P. 216. DOI: 10.1186/s12916-020-01673-z.

235. Severe Covid-19 GWAS Group. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure / Severe Covid-19 GWAS Group, D. Ellinghaus, F. Degenhardt [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383. – № 16. – P. 1522-1534. DOI: 10.1056/NEJMoa2020283.

236. Wang, F. Initial whole-genome sequencing and analysis of the host genetic contribution to COVID-19 severity and susceptibility / F. Wang, S. Huang, R. Gao [et al.] // *Cell Discovery*. – 2020. – Vol. 6. – № 1. – P. 83. DOI: 10.1038/s41421-020-00231-4.

237. Zimmerman, P.A. Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial

background, and quantified risk / P.A. Zimmerman, A. Buckler-White, G. Alkhatib [et al.] // *Molecular Medicine* (Cambridge, Mass.). – 1997. – Vol. 3. – № 1. – P. 23-36.

238. de Wilde, A.H. Host Factors in Coronavirus Replication / A.H. de Wilde, E.J. Snijder, M. Kikkert, M.J. van Hemert // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. – 2018. – Vol. 419. – P. 1-42. DOI: 10.1007/82\_2017\_25.

239. Menachery, V.D. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence / V.D. Menachery, B.L. Yount, K. Debbink [et al.] // *Nature Medicine*. – 2015. – Vol. 21. – № 12. – P. 1508-1513. DOI: 10.1038/nm.3985.

240. Imai, M. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets / M. Imai, T. Watanabe, M. Hatta [et al.] // *Nature*. – 2012. – Vol. 486. – № 7403. – P. 420-428. DOI: 10.1038/nature10831.

241. Maines, T.R. Effect of receptor binding domain mutations on receptor binding and transmissibility of avian influenza H5N1 viruses / T.R. Maines, L.-M. Chen, N. Van Hoeven [et al.] // *Virology*. – 2011. – Vol. 413. – № 1. – P. 139-147. DOI: 10.1016/j.virol.2011.02.015.

242. Klimov, A.I. Sequence changes in the live attenuated, cold-adapted variants of influenza A/Leningrad/134/57 (H2N2) virus / A.I. Klimov, N.J. Cox, W.V. Yotov [et al.] // *Virology*. – 1992. – Vol. 186. – № 2. – P. 795-797. DOI: 10.1016/0042-6822(92)90050-y.

243. Jernigan, D.B. H7N9: preparing for the unexpected in influenza / D.B. Jernigan, N.J. Cox // *Annual Review of Medicine*. – 2015. – Vol. 66. – P. 361-371. DOI: 10.1146/annurev-med-010714-112311.

244. Lin, J.-H. Challenges and Strategies of Laboratory Diagnosis for Newly Emerging Influenza Viruses in Taiwan: A Decade after SARS / J.-H. Lin, H.-S. Wu // *BioMed Research International*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 805306. DOI: 10.1155/2015/805306.

245. Rabaan, A.A. Comparative pathology, molecular pathogenicity, immunological features, and genetic characterization of three highly pathogenic human coronaviruses (MERS-CoV, SARS-CoV, and SARS-CoV-2) / A.A. Rabaan, A.A. Mutair, Z.A. Alawi [et al.] // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. – 2021. – Vol. 25. – № 22. – P. 7162-7184. DOI: 10.26355/eurrev\_202111\_27270.

246. Gussow, A.B. Genomic determinants of pathogenicity in SARS-CoV-2 and other human coronaviruses / A.B. Gussow, N. Auslander, G. Faure [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2020. – Vol. 117. – № 26. – P. 15193-15199. DOI: 10.1073/pnas.2008176117.

247. Islam, M.R. Genome-wide analysis of SARS-CoV-2 virus strains circulating worldwide implicates heterogeneity / M.R. Islam, M.N. Hoque, M.S. Rahman [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 14004. DOI: 10.1038/s41598-020-70812-6.

248. Hadfield, J. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution / J. Hadfield, C. Megill, S.M. Bell [et al.] // *Bioinformatics* (Oxford, England). – 2018. – Vol. 34.– № 23. – P. 4121-4123. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty407.
249. Zhao, Z. Moderate mutation rate in the SARS coronavirus genome and its implications / Z. Zhao, H. Li, X. Wu [et al.] // *BMC evolutionary biology*. – 2004. – Vol. 4. – P. 21. DOI: 10.1186/1471-2148-4-21.
250. Cotten, M. Spread, circulation, and evolution of the Middle East respiratory syndrome coronavirus / M. Cotten, S.J. Watson, A.I. Zumla [et al.] // *mBio*. – 2014. – Vol. 5. – № 1. – P. e01062-13. DOI: 10.1128/mBio.01062-13.
251. Vijgen, L. Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event / L. Vijgen, E. Keyaerts, E. Moys [et al.] // *Journal of Virology*. – 2005. – Vol. 79. – № 3. – P. 1595-1604. DOI: 10.1128/JVI.79.3.1595-1604.2005.
252. Smith, E.C. Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: evidence for proofreading and potential therapeutics / E.C. Smith, H. Blanc, M.C. Surdel [et al.] // *PLoS pathogens*. – 2013. – Vol. 9. – № 8. – P. e1003565. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003565.
253. Mercatelli, D. Geographic and Genomic Distribution of SARS-CoV-2 Mutations / D. Mercatelli, F.M. Giorgi // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1800. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01800.
254. Naqvi, A.A.T. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach / A.A.T. Naqvi, K. Fatima, T. Mohammad [et al.] // *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*. – 2020. – Vol. 1866. – № 10. – P. 165878. DOI: 10.1016/j.bbadis.2020.165878.
255. Vilar, S. One Year of SARS-CoV-2: How Much Has the Virus Changed? / S. Vilar, D.G. Isom // *Biology*. – 2021. – Vol. 10. – № 2. – P. 91. DOI: 10.3390/biology10020091.
256. Korber, B. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus / B. Korber, W.M. Fischer, S. Gnanakaran [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 182. – № 4. – P. 812-827.e19. DOI: 10.1016/j.cell.2020.06.043.
257. Laha, S. Characterizations of SARS-CoV-2 mutational profile, spike protein stability and viral transmission / S. Laha, J. Chakraborty, S. Das [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2020. – Vol. 85. – P. 104445. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104445.
258. Morais, I.J. The global population of SARS-CoV-2 is composed of six major subtypes / I.J. Morais, R.C. Polveiro, G.M. Souza [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 18289. DOI: 10.1038/s41598-020-74050-8.

259. Zhang, L. SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity / L. Zhang, C.B. Jackson, H. Mou [et al.] // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 6013. DOI: 10.1038/s41467-020-19808-4.
260. Meng, B. Recurrent emergence of SARS-CoV-2 spike deletion H69/V70 and its role in the Alpha variant B.1.1.7 / B. Meng, S.A. Kemp, G. Papa [et al.] // *Cell Reports*. – 2021. – Vol. 35. – № 13. – P. 109292. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109292.
261. Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. – Mode of access: <https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563> (date of access: 01.02.2023). – [Electronic resource].
262. Starr, T.N. Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding / T.N. Starr, A.J. Greaney, S.K. Hilton [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 182. – № 5. – P. 1295-1310.e20. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.012.
263. Tegally, H. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa / H. Tegally, E. Wilkinson, M. Giovanetti [et al.] // *Nature*. – 2021. – Vol. 592. – № 7854. – P. 438-443. DOI: 10.1038/s41586-021-03402-9.
264. Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings. – Mode of access: <https://virological.org/t/genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-manaus-preliminary-findings/586> (date of access: 01.02.2023). – [Electronic resource].
265. Khailany, R.A. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2 / R.A. Khailany, M. Safdar, M. Ozaslan // *Gene Reports*. – 2020. – Vol. 19. – P. 100682. DOI: 10.1016/j.genrep.2020.100682.
266. Krammer, F. SARS-CoV-2 vaccines in development / F. Krammer // *Nature*. – 2020. – Vol. 586. – № 7830. – P. 516-527. DOI: 10.1038/s41586-020-2798-3.
267. Ferretti, A.P. Unbiased Screens Show CD8+ T Cells of COVID-19 Patients Recognize Shared Epitopes in SARS-CoV-2 that Largely Reside outside the Spike Protein / A.P. Ferretti, T. Kula, Y. Wang [et al.] // *Immunity*. – 2020. – Vol. 53. – № 5. – P. 1095-1107.e3. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.10.006.
268. Wahba, L. An Extensive Meta-Metagenomic Search Identifies SARS-CoV-2-Homologous Sequences in Pangolin Lung Viromes / L. Wahba, N. Jain, A.Z. Fire [et al.] // *mSphere*. – 2020. – Vol. 5. – № 3. – P. e00160-20. DOI: 10.1128/mSphere.00160-20.
269. Forster, P. Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes / P. Forster, L. Forster, C. Renfrew, M. Forster // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2020. – Vol. 117. – № 17. – P. 9241-9243. DOI: 10.1073/pnas.2004999117.

270. Yang, X. Genetic cluster analysis of SARS-CoV-2 and the identification of those responsible for the major outbreaks in various countries / X. Yang, N. Dong, E.W.-C. Chan, S. Chen // *Emerging Microbes & Infections*. – 2020. – Vol. 9. – № 1. – P. 1287-1299. DOI: 10.1080/22221751.2020.1773745.
271. Tang, X. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2 / X. Tang, C. Wu, X. Li [et al.] // *National Science Review*. – 2020. – Vol. 7. – № 6. – P. 1012-1023. DOI: 10.1093/nsr/nwaa036.
272. Hahn, G. Unsupervised cluster analysis of SARS-CoV-2 genomes reflects its geographic progression and identifies distinct genetic subgroups of SARS-CoV-2 virus / G. Hahn, S. Lee, S.T. Weiss, C. Lange // *Genetic Epidemiology*. – 2021. – Vol. 45. – № 3. – P. 316-323. DOI: 10.1002/gepi.22373.
273. Kumar, S. An Evolutionary Portrait of the Progenitor SARS-CoV-2 and Its Dominant Offshoots in COVID-19 Pandemic / S. Kumar, Q. Tao, S. Weaver [et al.] // *Molecular biology and evolution*. – 2021. – Vol. 38. – № 8. – P. 3046-3059. DOI: 10.1093/molbev/msab118.
274. Sengupta, A. Clade GR and clade GH isolates of SARS-CoV-2 in Asia show highest amount of SNPs / A. Sengupta, Sk.S. Hassan, P.P. Choudhury // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2021. – Vol. 89. – P. 104724. DOI: 10.1016/j.meegid.2021.104724.
275. Rambaut, A. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology / A. Rambaut, E.C. Holmes, Б. O'Toole [et al.] // *Nature Microbiology*. – 2020. – Vol. 5. – № 11. – P. 1403-1407. DOI: 10.1038/s41564-020-0770-5.
276. Tracking SARS-CoV-2 variants. – Режим доступа: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants> (дата обращения: 18.10.2024). – [Электронный ресурс].
277. Viana, R. Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa / R. Viana, S. Moyo, D.G. Amoako [et al.] // *Nature*. – 2022. – Vol. 603. – № 7902. – P. 679-686. DOI: 10.1038/s41586-022-04411-y.
278. Акимкин, В.Г. COVID-19: эволюция пандемии в России. Сообщение II: динамика циркуляции геновариантов вируса SARS-CoV-2 / В.Г. Акимкин, А.Ю. Попова, К.Ф. Хафизов [и др.] // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2022. – Т. 99. – № 4. – С. 381-396. DOI: 10.36233/0372-9311-295.
279. Акимкин, В.Г. COVID-19: эволюция пандемии в России. Сообщение I: проявления эпидемического процесса COVID-19 / В.Г. Акимкин, А.Ю. Попова, А.А. Плоскирева [и др.] // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2022. – Т. 99. – № 3. – С. 269-286. DOI: 10.36233/0372-9311-276.

280. Komissarov, A.B. Genomic epidemiology of the early stages of the SARS-CoV-2 outbreak in Russia / A.B. Komissarov, K.R. Safina, S.K. Garushyants [et al.] // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 649. DOI: 10.1038/s41467-020-20880-z.

281. Shchetinin, A.M. A Case of Moderately Severe COVID-19 in a Healthcare Worker in Russia: Virus Isolation and Full Genome Sequencing / A.M. Shchetinin, E.V. Tsyganova, D.N. Protsenko [et al.] // *Cureus*. – 2021. – Vol. 13. – № 3. – P. e13733. DOI: 10.7759/cureus.13733.

282. Kozlovskaya, L. Isolation and phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 variants collected in Russia during the COVID-19 outbreak / L. Kozlovskaya, A. Pinaeva, G. Ignatyev [et al.] // *International journal of infectious diseases*: – 2020. – Vol. 99. – P. 40-46. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.07.024.

283. Платформа VGARus. – Режим доступа: <https://www.crie.ru/about/aggregation/vgarus.php> (дата обращения: 18.10.2024). – [Электронный ресурс].

284. Mathieu, E. A global database of COVID-19 vaccinations / E. Mathieu, H. Ritchie, E. Ortiz-Ospina [et al.] // *Nature Human Behaviour*. – 2021. – Vol. 5. – № 7. – P. 947-953. DOI: 10.1038/s41562-021-01122-8.

285. Higdon, M.M. A Systematic Review of Coronavirus Disease 2019 Vaccine Efficacy and Effectiveness Against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection and Disease / M.M. Higdon, B. Wahl, C.B. Jones [et al.] // *Open Forum Infectious Diseases*. – 2022. – Vol. 9. – № 6. – P. ofac138. DOI: 10.1093/ofid/ofac138.

286. Kandimalla, R. Counting on COVID-19 Vaccine: Insights into the Current Strategies, Progress and Future Challenges / R. Kandimalla, P. Chakraborty, J. Vallamkondu [et al.] // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9. – № 11. – P. 1740. DOI: 10.3390/biomedicines9111740.

287. Marcelin, J.R. COVID-19 Vaccines and SARS-CoV-2 Transmission in the Era of New Variants: A Review and Perspective / J.R. Marcelin, A. Pettifor, H. Janes [et al.] // *Open Forum Infectious Diseases*. – 2022. – Vol. 9. – № 5. – P. ofac124. DOI: 10.1093/ofid/ofac124.

288. Marfe, G. Effectiveness of COVID-19 vaccines and their challenges (Review) / G. Marfe, S. Perna, A.K. Shukla // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2021. – Vol. 22. – № 6. – P. 1407. DOI: 10.3892/etm.2021.10843.

289. Dupont, L. Neutralizing antibody activity in convalescent sera from infection in humans with SARS-CoV-2 and variants of concern / L. Dupont, L.B. Snell, C. Graham [et al.] // *Nature Microbiology*. – 2021. – Vol. 6. – № 11. – P. 1433-1442. DOI: 10.1038/s41564-021-00974-0.

290. Saito, A. Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation / A. Saito, T. Irie, R. Suzuki [et al.] // *Nature*. – 2022. – Vol. 602. – № 7896. – P. 300-306. DOI: 10.1038/s41586-021-04266-9.



291. Tao, K. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants / K. Tao, P.L. Tzou, J. Nouhin [et al.] // *Nature Reviews. Genetics*. – 2021. – Vol. 22. – № 12. – P. 757-773. DOI: 10.1038/s41576-021-00408-x.
292. Bowen, J.E. Omicron spike function and neutralizing activity elicited by a comprehensive panel of vaccines / J.E. Bowen, A. Addetia, H.V. Dang [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. – 2022. – Vol. 377. – № 6608. – P. 890-894. DOI: 10.1126/science.abq0203.
293. Cele, S. Omicron extensively but incompletely escapes Pfizer BNT162b2 neutralization / S. Cele, L. Jackson, D.S. Khoury [et al.] // *Nature*. – 2022. – Vol. 602. – № 7898. – P. 654-656. DOI: 10.1038/s41586-021-04387-1.
294. Dejnirattisai, W. SARS-CoV-2 Omicron-B.1.1.529 leads to widespread escape from neutralizing antibody responses / W. Dejnirattisai, J. Huo, D. Zhou [et al.] // *Cell*. – 2022. – Vol. 185. – № 3. – P. 467-484.e15. DOI: 10.1016/j.cell.2021.12.046.
295. Lu, L. Neutralization of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Omicron Variant by Sera From BNT162b2 or CoronaVac Vaccine Recipients / L. Lu, B.W.Y. Mok, L.L. Chen [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2022. – Vol. 75. – № 1. – P. e822-e826. DOI: 10.1093/cid/ciab1041.
296. VanBlargan, L.A. An infectious SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron virus escapes neutralization by therapeutic monoclonal antibodies / L.A. VanBlargan, J.M. Errico, P.J. Halfmann [et al.] // *Nature Medicine*. – 2022. – Vol. 28. – № 3. – P. 490-495. DOI: 10.1038/s41591-021-01678-y.
297. Wang, Y. Resistance of SARS-CoV-2 Omicron variant to convalescent and CoronaVac vaccine plasma / Y. Wang, Y. Ma, Y. Xu [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. – 2022. – Vol. 11. – № 1. – P. 424-427. DOI: 10.1080/22221751.2022.2027219.
298. Sun, Y. Evolutionary analysis of Omicron variant BF.7 and BA.5.2 pandemic in China / Y. Sun, M. Wang, W. Lin [et al.] // *Journal of Biosafety and Biosecurity*. – 2023. – Vol. 5. – № 1. – P. 14-20. DOI: 10.1016/j.jobbb.2023.01.002.
299. Акимкин, В.Г. Стратегия геномного эпидемиологического надзора. Проблемы и перспективы / В.Г. Акимкин, Т.А. Семеновко, К.Ф. Хафизов [и др.]. – 2024. – Т. 101. – № 2. – С. 163-172. DOI: 10.36233/0372-9311-507.
300. Meo, S.A. Omicron new variant BA.2.86 (Pirola): Epidemiological, biological, and clinical characteristics - a global data-based analysis / S.A. Meo, A.S. Meo, D.C. Klonoff // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. – 2023. – Vol. 27. – № 19. – P. 9470-9476. DOI: 10.26355/eurrev\_202310\_33975.
301. Menegale, F. Evaluation of Waning of SARS-CoV-2 Vaccine-Induced Immunity: A Systematic Review and Meta-analysis / F. Menegale, M. Manica, A. Zardini [et al.] // *JAMA network open*. – 2023. – Vol. 6. – № 5. – P. e2310650. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2023.10650.

302. Paul, P. Effectiveness of the pre-Omicron COVID-19 vaccines against Omicron in reducing infection, hospitalization, severity, and mortality compared to Delta and other variants: A systematic review / P. Paul, A. El-Naas, O. Hamad [et al.] // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2023. – Vol. 19. – № 1. – P. 2167410. DOI: 10.1080/21645515.2023.2167410.

303. Amir, O. Protection against Omicron BA.1/BA.2 severe disease 0-7 months after BNT162b2 booster / O. Amir, Y. Goldberg, M. Mandel [et al.] // *Communications Biology*. – 2023. – Vol. 6. – № 1. – P. 315. DOI: 10.1038/s42003-023-04669-6.

304. Lau, J.J. Real-world COVID-19 vaccine effectiveness against the Omicron BA.2 variant in a SARS-CoV-2 infection-naive population / J.J. Lau, S.M.S. Cheng, K. Leung [et al.] // *Nature Medicine*. – 2023. – Vol. 29. – № 2. – P. 348-357. DOI: 10.1038/s41591-023-02219-5.

305. Chemaitelly, H. Duration of mRNA vaccine protection against SARS-CoV-2 Omicron BA.1 and BA.2 subvariants in Qatar / H. Chemaitelly, H.H. Ayoub, S. AlMukdad [et al.] // *Nature Communications*. – 2022. – Vol. 13. – P. 3082. DOI: 10.1038/s41467-022-30895-3.

306. Espíndola, O.M. Reduced ability to neutralize the Omicron variant among adults after infection and complete vaccination with BNT162b2, ChAdOx1, or CoronaVac and heterologous boosting / O.M. Espíndola, T.L. Fuller, M.F. de Araújo [et al.] // *Scientific Reports*. – 2023. – Vol. 13. – № 1. – P. 7437. DOI: 10.1038/s41598-023-34035-9.

307. Huijberts, A.J. Vaccine effectiveness of primary and booster COVID-19 vaccinations against SARS-CoV-2 infection in the Netherlands from July 12, 2021 to June 6, 2022: A prospective cohort study / A.J. Huijberts, B. de Gier, C.E. Hoeve [et al.] // *International journal of infectious diseases*: – 2023. – Vol. 133. – P. 36-42. DOI: 10.1016/j.ijid.2023.04.401.

308. Aiano, F. Antibody Persistence After Primary SARS-CoV-2 Infection and Protection Against Future Variants Including Omicron in Adolescents: National, Prospective Cohort Study / F. Aiano, G. Ireland, F. Baawuah [et al.] // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2023. – Vol. 42.– № 6. – P. 496-502. DOI: 10.1097/INF.0000000000003890.

309. Seidel, A. Serum neutralizing capacity and T-cell response against the omicron BA.1 variant in seropositive children and their parents one year after SARS-CoV-2 infection / A. Seidel, E.-M. Jacobsen, D. Fabricius [et al.] // *Frontiers in Pediatrics*. – 2023. – Vol. 11. – P. 1020865. DOI: 10.3389/fped.2023.1020865.

310. Guo, L. Omicron BA.1 breakthrough infections in inactivated COVID-19 vaccine recipients induced distinct pattern of antibody and T cell responses to different Omicron sublineages / L. Guo, Q. Zhang, J. Zhong [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. – 2023. – Vol. 12. – № 1. – P. 2202263. DOI: 10.1080/22221751.2023.2202263.

311. Chen, J. Identification of broad neutralizing antibodies against Omicron subvariants from COVID-19 convalescents and vaccine recipients / J. Chen, J. Yang, F. Chang [et al.] // *Virologica Sinica*. – 2023. – Vol. 38. – № 2. – P. 313-316. DOI: 10.1016/j.virs.2023.01.005.
312. Blanco-Lobo, P. Novel Approaches for The Development of Live Attenuated Influenza Vaccines / P. Blanco-Lobo, A. Nogales, L. Rodriguez, L. Martinez-Sobrido // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11. – № 2. – P. 190. DOI: 10.3390/v11020190.
313. Жданов, В.М. Живая гриппозная рекомбинантная вакцина в СССР: Разработка, изучение и практическое использование / В.М. Жданов, Г.И. Александрова, Ю.З. Гендон // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 1986. – № 7. – С. 3-14.
314. Ghendon, Y.Z. Recombinant cold-adapted attenuated influenza A vaccines for use in children: molecular genetic analysis of the cold-adapted donor and recombinants / Y.Z. Ghendon, F.I. Polezhaev, K.V. Lisovskaya [et al.] // *Infection and Immunity*. – 1984. – Vol. 44. – № 3. – P. 730-733. DOI: 10.1128/iai.44.3.730-733.1984.
315. Kiseleva, I.V. PB2 and PA genes control the expression of the temperature-sensitive phenotype of cold-adapted B/USSR/60/69 influenza master donor virus / I.V. Kiseleva, J.T.M. Voeten, L.C.P. Teley [et al.] // *The Journal of General Virology*. – 2010. – Vol. 91. – № Pt 4. – P. 931-937. DOI: 10.1099/vir.0.017996-0.
316. Rodriguez, L. Comparative Study of the Temperature Sensitive, Cold Adapted and Attenuated Mutations Present in the Master Donor Viruses of the Two Commercial Human Live Attenuated Influenza Vaccines / L. Rodriguez, P. Blanco-Lobo, E.C. Reilly [et al.] // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11. – № 10. – P. 928. DOI: 10.3390/v11100928.
317. Sridhar, S. Influenza Vaccination Strategies: Comparing Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines / S. Sridhar, K.A. Brokstad, R.J. Cox // *Vaccines*. – 2015. – Vol. 3. – Influenza Vaccination Strategies. – № 2. – P. 373-389. DOI: 10.3390/vaccines3020373.
318. Marshall, N. Influenza virus reassortment occurs with high frequency in the absence of segment mismatch / N. Marshall, L. Priyamvada, Z. Ende [et al.] // *PLoS pathogens*. – 2013. – Vol. 9. – № 6. – P. e1003421. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003421.
319. Engelhardt, O.G. Many ways to make an influenza virus – review of influenza virus reverse genetics methods / O.G. Engelhardt // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2013. – Vol. 7. – № 3. – P. 249-256. DOI: 10.1111/j.1750-2659.2012.00392.x.
320. Enami, M. Introduction of site-specific mutations into the genome of influenza virus. / M. Enami, W. Luytjes, M. Krystal, P. Palese // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1990. – Vol. 87. – № 10. – P. 3802-3805.

321. Luytjes, W. Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus / W. Luytjes, M. Krystal, M. Enami [et al.] // *Cell*. – 1989. – Vol. 59. – № 6. – P. 1107-1113. DOI: 10.1016/0092-8674(89)90766-6.
322. Fodor, E. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA / E. Fodor, L. Devenish, O.G. Engelhardt [et al.] // *Journal of Virology*. – 1999. – Vol. 73. – № 11. – P. 9679-9682. DOI: 10.1128/JVI.73.11.9679-9682.1999.
323. Neumann, G. Generation of influenza A virus from cloned cDNAs - historical perspective and outlook for the new millenium / G. Neumann, Y. Kawaoka // *Reviews in Medical Virology*. – 2002. – Vol. 12. – № 1. – P. 13-30. DOI: 10.1002/rmv.332.
324. Crescenzo-Chaigne, B. Rescue of influenza C virus from recombinant DNA / B. Crescenzo-Chaigne, S. van der Werf // *Journal of Virology*. – 2007. – Vol. 81. – № 20. – P. 11282-11289. DOI: 10.1128/JVI.00910-07.
325. de Wit, E. A reverse-genetics system for Influenza A virus using T7 RNA polymerase / E. de Wit, M.I.J. Spronken, G. Vervaet [et al.] // *The Journal of General Virology*. – 2007. – Vol. 88. – № Pt 4. – P. 1281-1287. DOI: 10.1099/vir.0.82452-0.
326. Koudstaal, W. Suitability of PER.C6 cells to generate epidemic and pandemic influenza vaccine strains by reverse genetics / W. Koudstaal, L. Hartgroves, M. Havenga [et al.] // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27. – № 19. – P. 2588-2593. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.02.033.
327. Muraki, Y. A mutation on influenza C virus M1 protein affects virion morphology by altering the membrane affinity of the protein / Y. Muraki, T. Murata, E. Takashita [et al.] // *Journal of Virology*. – 2007. – Vol. 81. – № 16. – P. 8766-8773. DOI: 10.1128/JVI.00075-07.
328. Hoffmann, E. «Ambisense» approach for the generation of influenza A virus: vRNA and mRNA synthesis from one template / E. Hoffmann, G. Neumann, G. Hobom [et al.] // *Virology*. – 2000. – Vol. 267. – № 2. – P. 310-317. DOI: 10.1006/viro.1999.0140.
329. Hoffmann, E. Unidirectional RNA polymerase I-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids / E. Hoffmann, R.G. Webster // *The Journal of General Virology*. – 2000. – Vol. 81. – № Pt 12. – P. 2843-2847. DOI: 10.1099/0022-1317-81-12-2843.
330. Massin, P. Cloning of the chicken RNA polymerase I promoter and use for reverse genetics of influenza A viruses in avian cells / P. Massin, P. Rodrigues, M. Marasescu [et al.] // *Journal of Virology*. – 2005. – Vol. 79. – № 21. – P. 13811-13816. DOI: 10.1128/JVI.79.21.13811-13816.2005.
331. Murakami, S. Establishment of canine RNA polymerase I-driven reverse genetics for influenza A virus: its application for H5N1 vaccine production / S. Murakami, T. Horimoto, S.

Yamada [et al.] // *Journal of Virology*. – 2008. – Vol. 82. – № 3. – P. 1605-1609. DOI: 10.1128/JVI.01876-07.

332. Neumann, G. An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production / G. Neumann, K. Fujii, Y. Kino, Y. Kawaoka // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2005. – Vol. 102. – № 46. – P. 16825-16829. DOI: 10.1073/pnas.0505587102.

333. Bright, R.A. Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin / R.A. Bright, D.M. Carter, S. Daniluk [et al.] // *Vaccine*. – 2007. – Vol. 25. – № 19. – P. 3871-3878. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.01.106.

334. Doroshenko, A. Trivalent MDCK cell culture-derived influenza vaccine Optaflu (Novartis Vaccines) / A. Doroshenko, S.A. Halperin // *Expert Review of Vaccines*. – 2009. – Vol. 8. – № 6. – P. 679-688. DOI: 10.1586/erv.09.31.

335. Galarza, J.M. Virus-like particle vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus challenge / J.M. Galarza, T. Latham, A. Cupo // *Viral Immunology*. – 2005. – Vol. 18. – № 2. – P. 365-372. DOI: 10.1089/vim.2005.18.365.

336. Pushko, P. Evaluation of influenza virus-like particles and Novasome adjuvant as candidate vaccine for avian influenza / P. Pushko, T.M. Tumpey, N. Van Hoeven [et al.] // *Vaccine*. – 2007. – Vol. 25. – № 21. – P. 4283-4290. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.02.059.

337. Pushko, P. Influenza virus-like particles comprised of the HA, NA, and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice / P. Pushko, T.M. Tumpey, F. Bu [et al.] // *Vaccine*. – 2005. – Vol. 23. – № 50. – P. 5751-5759. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.07.098.

338. Quan, F.-S. Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus / F.-S. Quan, C. Huang, R.W. Compans, S.-M. Kang // *Journal of Virology*. – 2007. – Vol. 81. – № 7. – P. 3514-3524. DOI: 10.1128/JVI.02052-06.

339. Vinnemeier, C.D. Immunogenicity and safety of an inactivated 2012/2013 trivalent influenza vaccine produced in mammalian cell culture (Optaflu®): an open label, uncontrolled study / C.D. Vinnemeier, J. Fischer-Herr, S. Meyer [et al.] // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2014. – Vol. 10. – № 2. – P. 441-448. DOI: 10.4161/hv.27140.

340. Traynor, K. First recombinant flu vaccine approved / K. Traynor // *American journal of health-system pharmacy: AJHP: official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. – 2013. – Vol. 70. – № 5. – P. 382. DOI: 10.2146/news130016.

341. Yang, L.P.H. Recombinant trivalent influenza vaccine (flublok®): a review of its use in the prevention of seasonal influenza in adults / L.P.H. Yang // *Drugs*. – 2013. – Vol. 73. – № 12. – P. 1357-1366. DOI: 10.1007/s40265-013-0103-6.

342. Caspard, H. Live-Attenuated Influenza Vaccine Effectiveness in Children From 2009 to 2015-2016: A Systematic Review and Meta-Analysis / H. Caspard, R.M. Mallory, J. Yu, C.S. Ambrose // *Open Forum Infectious Diseases*. – 2017. – Vol. 4. – № 3. – P. ofx111. DOI: 10.1093/ofid/ofx111.
343. Ambrose, C.S. Letter to the editor: Potential causes of the decreased effectiveness of the influenza A(H1N1)pdm09 strain in live attenuated influenza vaccines / C.S. Ambrose, H. Bright, R. Mallory // *Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*. – 2016. – Vol. 21. – № 45. – P. 30394. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.45.30394.
344. Clark, A.M. Functional Evolution of Influenza Virus NS1 Protein in Currently Circulating Human 2009 Pandemic H1N1 Viruses / A.M. Clark, A. Nogales, L. Martinez-Sobrido [et al.] // *Journal of Virology*. – 2017. – Vol. 91. – № 17. – P. e00721-17. DOI: 10.1128/JVI.00721-17.
345. Nogales, A. Modulation of Innate Immune Responses by the Influenza A NS1 and PA-X Proteins / A. Nogales, L. Martinez-Sobrido, D.J. Topham, M.L. DeDiego // *Viruses*. – 2018. – Vol. 10. – № 12. – P. 708. DOI: 10.3390/v10120708.
346. Choi, E. Development of a dual-protective live attenuated vaccine against H5N1 and H9N2 avian influenza viruses by modifying the NS1 gene / E. Choi, M.-S. Song, S.-J. Park [et al.] // *Archives of Virology*. – 2015. – Vol. 160. – № 7. – P. 1729-1740. DOI: 10.1007/s00705-015-2442-y.
347. Jang, H. Efficacy and synergy of live-attenuated and inactivated influenza vaccines in young chickens / H. Jang, M. Elaish, M. Kc [et al.] // *PloS One*. – 2018. – Vol. 13. – № 4. – P. e0195285. DOI: 10.1371/journal.pone.0195285.
348. Jang, H. Association between Interferon Response and Protective Efficacy of NS1-Truncated Mutants as Influenza Vaccine Candidates in Chickens / H. Jang, J.M. Ngunjiri, C.-W. Lee // *PloS One*. – 2016. – Vol. 11. – № 6. – P. e0156603. DOI: 10.1371/journal.pone.0156603.
349. Steel, J. Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza / J. Steel, A.C. Lowen, L. Pena [et al.] // *Journal of Virology*. – 2009. – Vol. 83. – № 4. – P. 1742-1753. DOI: 10.1128/JVI.01920-08.
350. Wang, L. Characterization of influenza virus variants with different sizes of the non-structural (NS) genes and their potential as a live influenza vaccine in poultry / L. Wang, D.L. Suarez, M. Pantin-Jackwood [et al.] // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26. – № 29-30. – P. 3580-3586. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.05.001.
351. Nogales, A. Canine influenza viruses with modified NS1 proteins for the development of live-attenuated vaccines / A. Nogales, K. Huang, C. Chauchň [et al.] // *Virology*. – 2017. – Vol. 500. – P. 1-10. DOI: 10.1016/j.virol.2016.10.008.

352. Quinlivan, M. Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein / M. Quinlivan, D. Zamarin, A. García-Sastre [et al.] // *Journal of Virology*. – 2005. – Vol. 79. – № 13. – P. 8431-8439. DOI: 10.1128/JVI.79.13.8431-8439.2005.

353. Kappes, M.A. Vaccination with NS1-truncated H3N2 swine influenza virus primes T cells and confers cross-protection against an H1N1 heterosubtypic challenge in pigs / M.A. Kappes, M.R. Sandbulte, R. Platt [et al.] // *Vaccine*. – 2012. – Vol. 30. – № 2. – P. 280-288. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.10.098.

354. Richt, J.A. Vaccination of pigs against swine influenza viruses by using an NS1-truncated modified live-virus vaccine / J.A. Richt, P. Lekcharoensuk, K.M. Lager [et al.] // *Journal of Virology*. – 2006. – Vol. 80. – № 22. – P. 11009-11018. DOI: 10.1128/JVI.00787-06.

355. Solyrzano, A. Mutations in the NS1 protein of swine influenza virus impair anti-interferon activity and confer attenuation in pigs / A. Solyrzano, R.J. Webby, K.M. Lager [et al.] // *Journal of Virology*. – 2005. – Vol. 79. – № 12. – P. 7535-7543. DOI: 10.1128/JVI.79.12.7535-7543.2005.

356. Vincent, A.L. Efficacy of intranasal administration of a truncated NS1 modified live influenza virus vaccine in swine / A.L. Vincent, W. Ma, K.M. Lager [et al.] // *Vaccine*. – 2007. – Vol. 25. – № 47. – P. 7999-8009. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.09.019.

357. Baskin, C.R. Functional genomic and serological analysis of the protective immune response resulting from vaccination of macaques with an NS1-truncated influenza virus / C.R. Baskin, H. Bielefeldt-Ohmann, A. García-Sastre [et al.] // *Journal of Virology*. – 2007. – Vol. 81. – № 21. – P. 11817-11827. DOI: 10.1128/JVI.00590-07.

358. Pica, N. NS1-truncated live attenuated virus vaccine provides robust protection to aged mice from viral challenge / N. Pica, R.A. Langlois, F. Krammer [et al.] // *Journal of Virology*. – 2012. – Vol. 86. – № 19. – P. 10293-10301. DOI: 10.1128/JVI.01131-12.

359. Wacheck, V. A novel type of influenza vaccine: safety and immunogenicity of replication-deficient influenza virus created by deletion of the interferon antagonist NS1 / V. Wacheck, A. Egorov, F. Groiss [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 201. – № 3. – P. 354-362. DOI: 10.1086/649428.

360. Nogales, A. Functional Evolution of the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus NS1 and PA in Humans / A. Nogales, L. Martinez-Sobrido, K. Chiem [et al.] // *Journal of Virology*. – 2018. – Vol. 92. – № 19. – P. e01206-18. DOI: 10.1128/JVI.01206-18.

361. Hilimire, T.A. Increasing the Safety Profile of the Master Donor Live Attenuated Influenza Vaccine / T.A. Hilimire, A. Nogales, K. Chiem [et al.] // *Pathogens (Basel, Switzerland)*. – 2020. – Vol. 9. – № 2. – P. 86. DOI: 10.3390/pathogens9020086.

362. Nogales, A. Interplay of PA-X and NS1 Proteins in Replication and Pathogenesis of a Temperature-Sensitive 2009 Pandemic H1N1 Influenza A Virus / A. Nogales, L. Rodriguez, M.L.

DeDiego [et al.] // *Journal of Virology*. – 2017. – Vol. 91. – № 17. – P. e00720-17. DOI: 10.1128/JVI.00720-17.

363. Plotkin, J.B. Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias / J.B. Plotkin, G. Kudla // *Nature Reviews. Genetics*. – 2011. – Vol. 12. – № 1. – P. 32-42. DOI: 10.1038/nrg2899.

364. Bahir, I. Viral adaptation to host: a proteome-based analysis of codon usage and amino acid preferences / I. Bahir, M. Fromer, Y. Prat, M. Linial // *Molecular Systems Biology*. – 2009. – Vol. 5. – P. 311. DOI: 10.1038/msb.2009.71.

365. Goci, N. Pandemic influenza A virus codon usage revisited: biases, adaptation and implications for vaccine strain development / N. Goci, A. Iriarte, V. Comas [et al.] // *Virology Journal*. – 2012. – Vol. 9. – P. 263. DOI: 10.1186/1743-422X-9-263.

366. Baker, S.F. Downregulating viral gene expression: codon usage bias manipulation for the generation of novel influenza A virus vaccines / S.F. Baker, A. Nogales, L. Martínez-Sobrido // *Future Virology*. – 2015. – Vol. 10. – № 6. – P. 715-730. DOI: 10.2217/fvl.15.31.

367. Broadbent, A.J. Evaluation of the attenuation, immunogenicity, and efficacy of a live virus vaccine generated by codon-pair bias de-optimization of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus, in ferrets / A.J. Broadbent, C.P. Santos, A. Anafu [et al.] // *Vaccine*. – 2016. – Vol. 34. – № 4. – P. 563-570. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.11.054.

368. Mueller, S. Live attenuated influenza virus vaccines by computer-aided rational design / S. Mueller, J.R. Coleman, D. Papamichail [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2010. – Vol. 28. – № 7. – P. 723-726. DOI: 10.1038/nbt.1636.

369. Nogales, A. Influenza A virus attenuation by codon deoptimization of the NS gene for vaccine development / A. Nogales, S.F. Baker, E. Ortiz-Riaco [et al.] // *Journal of Virology*. – 2014. – Vol. 88. – № 18. – P. 10525-10540. DOI: 10.1128/JVI.01565-14.

370. Yang, C. Deliberate reduction of hemagglutinin and neuraminidase expression of influenza virus leads to an ultraprotective live vaccine in mice / C. Yang, S. Skiena, B. Futcher [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – Vol. 110. – № 23. – P. 9481-9486. DOI: 10.1073/pnas.1307473110.

371. Dou, D. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement / D. Dou, R. Revol, H. Ostbye [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1581. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01581.

372. Nogales, A. Rearrangement of Influenza Virus Spliced Segments for the Development of Live-Attenuated Vaccines / A. Nogales, M.L. DeDiego, D.J. Topham, L. Martínez-Sobrido // *Journal of Virology*. – 2016. – Vol. 90. – № 14. – P. 6291-6302. DOI: 10.1128/JVI.00410-16.



373. Pena, L. Influenza viruses with rearranged genomes as live-attenuated vaccines / L. Pena, T. Sutton, A. Chockalingam [et al.] // *Journal of Virology*. – 2013. – Vol. 87. – № 9. – P. 5118-5127. DOI: 10.1128/JVI.02490-12.
374. Lu, B. Improvement of influenza A/Fujian/411/02 (H3N2) virus growth in embryonated chicken eggs by balancing the hemagglutinin and neuraminidase activities, using reverse genetics / B. Lu, H. Zhou, D. Ye [et al.] // *Journal of Virology*. – 2005. – Vol. 79. – № 11. – P. 6763-6771. DOI: 10.1128/JVI.79.11.6763-6771.2005.
375. Baker, S.F. Competitive detection of influenza neutralizing antibodies using a novel bivalent fluorescence-based microneutralization assay (BiFMA) / S.F. Baker, A. Nogales, F.W. Santiago [et al.] // *Vaccine*. – 2015. – Vol. 33. – № 30. – P. 3562-3570. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.05.049.
376. Martínez-Sobrido, L. Hemagglutinin-pseudotyped green fluorescent protein-expressing influenza viruses for the detection of influenza virus neutralizing antibodies / L. Martínez-Sobrido, R. Cadagan, J. Steel [et al.] // *Journal of Virology*. – 2010. – Vol. 84. – № 4. – P. 2157-2163. DOI: 10.1128/JVI.01433-09.
377. Nogales, A. Development and applications of single-cycle infectious influenza A virus (sciIAV) / A. Nogales, S.F. Baker, W. Domm, L. Martinez-Sobrido // *Virus Research*. – 2016. – Vol. 216. – P. 26-40. DOI: 10.1016/j.virusres.2015.07.013.
378. Baker, S.F. Influenza A and B virus intertypic reassortment through compatible viral packaging signals / S.F. Baker, A. Nogales, C. Finch [et al.] // *Journal of Virology*. – 2014. – Vol. 88. – № 18. – P. 10778-10791. DOI: 10.1128/JVI.01440-14.
379. Baker, S.F. Protection against lethal influenza with a viral mimic / S.F. Baker, H. Guo, R.A. Albrecht [et al.] // *Journal of Virology*. – 2013. – Vol. 87. – № 15. – P. 8591-8605. DOI: 10.1128/JVI.01081-13.
380. Fonseca, W. A recombinant influenza virus vaccine expressing the F protein of respiratory syncytial virus / W. Fonseca, M. Ozawa, M. Hatta [et al.] // *Archives of Virology*. – 2014. – Vol. 159. – № 5. – P. 1067-1077. DOI: 10.1007/s00705-013-1932-z.
381. Guo, H. Induction of CD8 T cell heterologous protection by a single dose of single-cycle infectious influenza virus / H. Guo, S.F. Baker, L. Martinez-Sobrido, D.J. Topham // *Journal of Virology*. – 2014. – Vol. 88. – № 20. – P. 12006-12016. DOI: 10.1128/JVI.01847-14.
382. Hatta, Y. M2SR, a novel live influenza vaccine, protects mice and ferrets against highly pathogenic avian influenza / Y. Hatta, D. Boltz, S. Sarawar [et al.] // *Vaccine*. – 2017. – Vol. 35. – № 33. – P. 4177-4183. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.06.039.

383. Inagaki, A. Competitive incorporation of homologous gene segments of influenza A virus into virions / A. Inagaki, H. Goto, S. Kakugawa [et al.] // *Journal of Virology*. – 2012. – Vol. 86. – № 18. – P. 10200-10202. DOI: 10.1128/JVI.01204-12.
384. Kobayashi, H. A replication-incompetent influenza virus bearing the HN glycoprotein of human parainfluenza virus as a bivalent vaccine / H. Kobayashi, K. Iwatsuki-Horimoto, M. Kiso [et al.] // *Vaccine*. – 2013. – Vol. 31. – № 52. – P. 6239-6246. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.10.029.
385. Masic, A. An eight-segment swine influenza virus harboring H1 and H3 hemagglutinins is attenuated and protective against H1N1 and H3N2 subtypes in pigs / A. Masic, H.-M. Pyo, S. Babiuk, Y. Zhou // *Journal of Virology*. – 2013. – Vol. 87. – № 18. – P. 10114-10125. DOI: 10.1128/JVI.01348-13.
386. Ozawa, M. Replication-incompetent influenza A viruses that stably express a foreign gene / M. Ozawa, S.T. Victor, A.S. Taft [et al.] // *The Journal of General Virology*. – 2011. – Vol. 92. – № Pt 12. – P. 2879-2888. DOI: 10.1099/vir.0.037648-0.
387. Sarawar, S. M2SR, a novel live single replication influenza virus vaccine, provides effective heterosubtypic protection in mice / S. Sarawar, Y. Hatta, S. Watanabe [et al.] // *Vaccine*. – 2016. – Vol. 34. – № 42. – P. 5090-5098. DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.08.061.
388. Shinya, K. Characterization of a neuraminidase-deficient influenza A virus as a potential gene delivery vector and a live vaccine / K. Shinya, Y. Fujii, H. Ito [et al.] // *Journal of Virology*. – 2004. – Vol. 78. – № 6. – P. 3083-3088. DOI: 10.1128/jvi.78.6.3083-3088.2004.
389. Uraki, R. A novel bivalent vaccine based on a PB2-knockout influenza virus protects mice from pandemic H1N1 and highly pathogenic H5N1 virus challenges / R. Uraki, M. Kiso, K. Iwatsuki-Horimoto [et al.] // *Journal of Virology*. – 2013. – Vol. 87. – № 14. – P. 7874-7881. DOI: 10.1128/JVI.00076-13.
390. Victor, S.T. A replication-incompetent PB2-knockout influenza A virus vaccine vector / S.T. Victor, S. Watanabe, H. Katsura [et al.] // *Journal of Virology*. – 2012. – Vol. 86. – № 8. – P. 4123-4128. DOI: 10.1128/JVI.06232-11.
391. Bottini, A. Identification of small molecules that interfere with H1N1 influenza A viral replication / A. Bottini, S.K. De, B.J.G. Baaten [et al.] // *ChemMedChem*. – 2012. – Vol. 7. – № 12. – P. 2227-2235. DOI: 10.1002/cmdc.201200453.
392. Si, L. Generation of influenza A viruses as live but replication-incompetent virus vaccines / L. Si, H. Xu, X. Zhou [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. – 2016. – Vol. 354. – № 6316. – P. 1170-1173. DOI: 10.1126/science.aah5869.
393. Fok, J.A. Genetic-Code-Expansion Strategies for Vaccine Development / J.A. Fok, C. Mayer // *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*. – 2020. – Vol. 21. – № 23. – P. 3291-3300. DOI: 10.1002/cbic.202000343.

394. Wang, N. Construction of a live-attenuated HIV-1 vaccine through genetic code expansion / N. Wang, Y. Li, W. Niu [et al.] // *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*. – 2014. – Vol. 53. – № 19. – P. 4867-4871. DOI: 10.1002/anie.201402092.
395. Yuan, Z. Controlling Multicycle Replication of Live-Attenuated HIV-1 Using an Unnatural Genetic Switch / Z. Yuan, N. Wang, G. Kang [et al.] // *ACS synthetic biology*. – 2017. – Vol. 6. – № 4. – P. 721-731. DOI: 10.1021/acssynbio.6b00373.
396. Hao, R. Amber codon is genetically unstable in generation of premature termination codon (PTC)-harbouring Foot-and-mouth disease virus (FMDV) via genetic code expansion / R. Hao, K. Ma, Y. Ru [et al.] // *RNA biology*. – 2021. – Vol. 18. – № 12. – P. 2330-2341. DOI: 10.1080/15476286.2021.1907055.
397. Frey, T.K. Molecular biology of rubella virus / T.K. Frey // *Advances in Virus Research*. – 1994. – Vol. 44. – P. 69-160. DOI: 10.1016/s0065-3527(08)60328-0.
398. Bardeletti, G. Morphology, biochemical analysis and neuraminidase activity of rubella virus / G. Bardeletti, N. Kessler, M. Aymard-Henry // *Archives of Virology*. – 1975. – Vol. 49. – № 2-3. – P. 175-186. DOI: 10.1007/BF01317536.
399. Otani, N. Changes in the Epidemiology of Rubella: The Influence of Vaccine-Introducing Methods and COVID-19 / N. Otani, M. Shima, T. Ueda [et al.] // *Vaccines*. – 2023. – Vol. 11. – № 8. – P. 1358. DOI: 10.3390/vaccines11081358.
400. Oishi, K. [Re-emerging Rubella Epidemic and Public Health Measures in Japan] / K. Oishi, H. Satoh, K. Tanaka-Taya // *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. – 2020. – Vol. 140. – № 7. – P. 901-904. DOI: 10.1248/yakushi.19-00255-3.
401. Rubella vaccines: WHO position paper - July 2020. – Mode of access: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-WER9527> (date of access: 27.08.2023). – [Electronic resource].
402. Zimmerman, L.A. Progress Toward Rubella and Congenital Rubella Syndrome Control and Elimination - Worldwide, 2012-2020 / L.A. Zimmerman, J.K. Knapp, S. Antoni [et al.] // *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*. – 2022. – Vol. 71. – № 6. – P. 196-201. DOI: 10.15585/mmwr.mm7106a2.
403. Meyer, H.M. Attenuated rubella viruses. Laboratory and clinical characteristics / H.M. Meyer, P.D. Parkman, T.E. Hobbins [et al.] // *American Journal of Diseases of Children (1960)*. – 1969. – Vol. 118. – № 2. – P. 155-165. DOI: 10.1001/archpedi.1969.02100040157001.
404. Best, J.M. Rubella vaccines: past, present and future / J.M. Best // *Epidemiology and Infection*. – 1991. – Vol. 107. – № 1. – P. 17-30. DOI: 10.1017/s0950268800048640.
405. Otsuki, N. Elucidation of the full genetic information of Japanese rubella vaccines and the genetic changes associated with in vitro and in vivo vaccine virus phenotypes / N. Otsuki, H. Abo, T.

Kubota [et al.] // *Vaccine*. – 2011. – Vol. 29. – № 10. – P. 1863-1873. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.01.016.

406. Дмитриев, Г.В. Генетические детерминанты аттенуации вируса краснухи / Г.В. Дмитриев, Т.К. Борисова, Е.Б. Файзулов, Р.Г. Десяткова, В.В. Зверев // *Вопросы вирусологии*. – 2014. – Т. 59. – № 6. – С. 12-15.

407. Sakata, M. Histidine at position 1042 of the p150 region of a KRT live attenuated rubella vaccine strain is responsible for the temperature sensitivity / M. Sakata, K. Komase, T. Nakayama // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27. – № 2. – P. 234-242. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.10.049.

408. Sakata, M. Protease and helicase domains are related to the temperature sensitivity of wild-type rubella viruses / M. Sakata, T. Nakayama // *Vaccine*. – 2011. – Vol. 29. – № 5. – P. 1107-1113. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.11.074.

409. Zhou, Y. A cysteine-rich metal-binding domain from rubella virus non-structural protein is essential for viral protease activity and virus replication / Y. Zhou, W.-P. Tzeng, Y. Ye [et al.] // *The Biochemical Journal*. – 2009. – Vol. 417. – № 2. – P. 477-483. DOI: 10.1042/BJ20081468.

410. Liang, Y. Rubella virus RNA replication is cis-preferential and synthesis of negative- and positive-strand RNAs is regulated by the processing of nonstructural protein / Y. Liang, S. Gillam // *Virology*. – 2001. – Vol. 282. – № 2. – P. 307-319. DOI: 10.1006/viro.2001.0862.

411. Zhou, Y. Calcium-dependent association of calmodulin with the rubella virus nonstructural protease domain / Y. Zhou, W.-P. Tzeng, H.-C. Wong [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – Vol. 285. – № 12. – P. 8855-8868. DOI: 10.1074/jbc.M109.097063.

412. Feikin, D.R. Duration of effectiveness of vaccines against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease: results of a systematic review and meta-regression / D.R. Feikin, M.M. Higdon, L.J. Abu-Raddad [et al.] // *Lancet (London, England)*. – 2022. – Vol. 399. – № 10328. – P. 924-944. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)00152-0.

413. Beladiya, J. Safety and efficacy of COVID-19 vaccines: A systematic review and meta-analysis of controlled and randomized clinical trials / J. Beladiya, A. Kumar, Y. Vasava [et al.] // *Reviews in Medical Virology*. – 2024. – Vol. 34. – № 1. – P. e2507. DOI: 10.1002/rmv.2507.

414. Chalkias, S. A Bivalent Omicron-Containing Booster Vaccine against Covid-19 / S. Chalkias, C. Harper, K. Vrbicky [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2022. – Vol. 387. – № 14. – P. 1279-1291. DOI: 10.1056/NEJMoa2208343.

415. Chen, J.-M. Should the world collaborate imminently to develop neglected live-attenuated vaccines for COVID-19? / J.-M. Chen // *Journal of Medical Virology*. – 2022. – Vol. 94. – № 1. – P. 82-87. DOI: 10.1002/jmv.27335.

416. Gołowski, M. The Reassessed Potential of SARS-CoV-2 Attenuation for COVID-19 Vaccine Development-A Systematic Review / M. Gołowski, P. Lewandowski, I. Jabłońska, M. Delijewski // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14. – № 5. – P. 991. DOI: 10.3390/v14050991.
417. Abdoli, M. Intranasal administration of cold-adapted live-attenuated SARS-CoV-2 candidate vaccine confers protection against SARS-CoV-2 / M. Abdoli, M. Shafaati, L.K. Ghamsari, A. Abdoli // *Virus Research*. – 2022. – Vol. 319. – P. 198857. DOI: 10.1016/j.virusres.2022.198857.
418. Faizuloev, E. Cold-adapted SARS-CoV-2 variants with different temperature sensitivity exhibit an attenuated phenotype and confer protective immunity / E. Faizuloev, A. Gracheva, E. Korchevaya, D. Smirnova, R. Samoilikov, A. Pankratov, G. Trunova, V. Khokhlova, Y. Ammour, O. Petrusha, A. Poromov, I. Leneva, O. Svitich, V. Zverev // *Vaccine*. – 2023. – Vol. 41. – № 4. – P. 892-902. DOI: 10.1016/j.vaccine.2022.12.019.
419. Seo, S.H. Cold-Adapted Live Attenuated SARS-Cov-2 Vaccine Completely Protects Human ACE2 Transgenic Mice from SARS-Cov-2 Infection / S.H. Seo, Y. Jang // *Vaccines*. – 2020. – Vol. 8. – № 4. – P. 584. DOI: 10.3390/vaccines8040584.
420. Xu, J. The Cold-Adapted, Temperature-Sensitive SARS-CoV-2 Strain TS11 Is Attenuated in Syrian Hamsters and a Candidate Attenuated Vaccine / J. Xu, M. Liu, X. Niu [et al.] // *Viruses*. – 2022. – Vol. 15. – № 1. – P. 95. DOI: 10.3390/v15010095.
421. Liu, S. Intranasal delivery of a rationally attenuated SARS-CoV-2 is immunogenic and protective in Syrian hamsters / S. Liu, C.B. Stauff, P. Selvaraj [et al.] // *Nature Communications*. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 6792. DOI: 10.1038/s41467-022-34571-4.
422. Liu, Y. A live-attenuated SARS-CoV-2 vaccine candidate with accessory protein deletions / Y. Liu, X. Zhang, J. Liu [et al.] // *Nature Communications*. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 4337. DOI: 10.1038/s41467-022-31930-z.
423. Trimpert, J. Development of safe and highly protective live-attenuated SARS-CoV-2 vaccine candidates by genome recoding / J. Trimpert, K. Dietert, T.C. Firsching [et al.] // *Cell Reports*. – 2021. – Vol. 36. – № 5. – P. 109493. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109493.
424. Ye, Z.-W. Intranasal administration of a single dose of a candidate live attenuated vaccine derived from an NSP16-deficient SARS-CoV-2 strain confers sterilizing immunity in animals / Z.-W. Ye, C.P. Ong, K. Tang [et al.] // *Cellular & Molecular Immunology*. – 2022. – Vol. 19. – № 5. – P. 588-601. DOI: 10.1038/s41423-022-00855-4.
425. Khoshnood, S. An overview on inactivated and live-attenuated SARS-CoV-2 vaccines / S. Khoshnood, M. Arshadi, S. Akrami [et al.] // *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. – 2022. – Vol. 36. – № 5. – P. e24418. DOI: 10.1002/jcla.24418.
426. Plotkin, S.A. History of RA27/3 rubella vaccine / S.A. Plotkin, F. Buser // *Reviews of Infectious Diseases*. – 1985. – Vol. 7 Suppl 1. – P. S77-78. DOI: 10.1093/clinids/7.supplement\_1.s77.

427. Smorodintsev, A.A. Live vaccines against influenza, adenoviruses, measles, and mumps / A.A. Smorodintsev, G.I. Alexandrova, L.M. Boychuck [et al.] // *Archives of Environmental Health*. – 1969. – Vol. 18. – № 1. – P. 105-114. DOI: 10.1080/00039896.1969.10665376.
428. Rzechorzek, N.M. A daily temperature rhythm in the human brain predicts survival after brain injury / N.M. Rzechorzek, M.J. Thrippleton, F.M. Chappell [et al.] // *Brain*. – 2022. – Vol. 145. – № 6. – P. 2031-2048. DOI: 10.1093/brain/awab466.
429. Okamura, S. Could live attenuated vaccines better control COVID-19? / S. Okamura, H. Ebina // *Vaccine*. – 2021. – Vol. 39. – № 39. – P. 5719-5726. DOI: 10.1016/j.vaccine.2021.08.018.
430. Murphy, B.R. Principles underlying the development and use of live attenuated cold-adapted influenza A and B virus vaccines / B.R. Murphy, K. Coelingh // *Viral Immunology*. – 2002. – Vol. 15. – № 2. – P. 295-323. DOI: 10.1089/08828240260066242.
431. Li, X.-F. A highly immunogenic live-attenuated vaccine candidate prevents SARS-CoV-2 infection and transmission in hamsters / X.-F. Li, Z. Cui, H. Fan [et al.] // *Innovation (Cambridge (Mass.))*. – 2022. – Vol. 3. – № 2. – P. 100221. DOI: 10.1016/j.xinn.2022.100221.
432. Корчевая Е.Р. Живые аттенуированные вакцины против COVID-19: подходы к разработке и перспективы клинического применения / Е.Р. Корчевая, А.В. Грачева, И.Н. Дьяков В.В., Зверев, Е.Б. Файзулов // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2023. – Т. 100. – № 3. – С. 225-236. DOI: /10.36233/0372-9311-404.
433. Edelheit, O. Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies / O. Edelheit, A. Hanukoglu, I. Hanukoglu // *BMC biotechnology*. – 2009. – Vol. 9. – P. 61. DOI: 10.1186/1472-6750-9-61.
434. Flavell, R.A. Site-directed mutagenesis: effect of an extracistronic mutation on the in vitro propagation of bacteriophage Qbeta RNA / R.A. Flavell, D.L. Sabo, E.F. Bandle, C. Weissmann // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1975. – Vol. 72. – Site-directed mutagenesis. – № 1. – P. 367-371. DOI: 10.1073/pnas.72.1.367.
435. Shortle, D. Local mutagenesis: a method for generating viral mutants with base substitutions in preselected regions of the viral genome / D. Shortle, D. Nathans // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1978. – Vol. 75. – № 5. – P. 2170-2174. DOI: 10.1073/pnas.75.5.2170.
436. Zhang, Z. Live attenuated coronavirus vaccines deficient in N7-Methyltransferase activity induce both humoral and cellular immune responses in mice / Z. Zhang, Q. Liu, Y. Sun [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. – 2021. – Vol. 10. – № 1. – P. 1626-1637. DOI: 10.1080/22221751.2021.1964385.

437. Groenke, N. Mechanism of Virus Attenuation by Codon Pair Deoptimization / N. Groenke, J. Trimpert, S. Merz [et al.] // *Cell Reports*. – 2020. – Vol. 31. – № 4. – P. 107586. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107586.

438. Ишмухаметов, А.А. Разработка вакцинных препаратов для профилактики полиомиелита: современное состояние проблемы (обзор) / А.А. Ишмухаметов, А.А. Синюгина, К.М. Чумаков // *Современные технологии в медицине*. – 2019. – Т. 11. – № 4. – С. 200-215. DOI: 10.17691/stm2019.11.4.22.

439. Tsfasman, T.M. Molecular mechanisms of reversion to the ts+ (non-temperature-sensitive) phenotype of influenza A cold-adapted (ca) virus strains / T.M. Tsfasman, S.G. Markushin, I.I. Akopova, Y.Z. Ghendon // *The Journal of General Virology*. – 2007. – Vol. 88. – № Pt 10. – P. 2724-2729. DOI: 10.1099/vir.0.83014-0.

440. Kurhade, C. Reverse genetic systems of SARS-CoV-2 for antiviral research / C. Kurhade, X. Xie, P.-Y. Shi // *Antiviral Research*. – 2023. – Vol. 210. – P. 105486. DOI: 10.1016/j.antiviral.2022.105486.

441. Xie, X. An Infectious cDNA Clone of SARS-CoV-2 / X. Xie, A. Muruato, K.G. Lokugamage [et al.] // *Cell Host & Microbe*. – 2020. – Vol. 27. – № 5. – P. 841-848.e3. DOI: 10.1016/j.chom.2020.04.004.

442. Ye, C. Rescue of SARS-CoV-2 from a Single Bacterial Artificial Chromosome / C. Ye, K. Chiem, J.-G. Park [et al.] // *mBio*. – 2020. – Vol. 11. – № 5. – P. e02168-20. DOI: 10.1128/mBio.02168-20.

443. Thi Nhu Thao, T. Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform / T. Thi Nhu Thao, F. Labroussaa, N. Ebert [et al.] // *Nature*. – 2020. – Vol. 582. – № 7813. – P. 561-565. DOI: 10.1038/s41586-020-2294-9.

444. Amarilla, A.A. A versatile reverse genetics platform for SARS-CoV-2 and other positive-strand RNA viruses / A.A. Amarilla, J.D.J. Sng, R. Parry [et al.] // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 3431. DOI: 10.1038/s41467-021-23779-5.

445. V'kovski, P. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2 / P. V'kovski, A. Kratzel, S. Steiner [et al.] // *Nature Reviews. Microbiology*. – 2021. – Vol. 19. – № 3. – P. 155-170. DOI: 10.1038/s41579-020-00468-6.

446. Woo, P.C.Y. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis / P.C.Y. Woo, Y. Huang, S.K.P. Lau, K.-Y. Yuen // *Viruses*. – 2010. – Vol. 2. – № 8. – P. 1804-1820. DOI: 10.3390/v2081803.

447. Hu, B. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19 / B. Hu, H. Guo, P. Zhou, Z.-L. Shi // *Nature Reviews. Microbiology*. – 2021. – Vol. 19. – № 3. – P. 141-154. DOI: 10.1038/s41579-020-00459-7.

448. Kee, J. SARS-CoV-2 disrupts host epigenetic regulation via histone mimicry / J. Kee, S. Thudium, D.M. Renner [et al.] // *Nature*. – 2022. – Vol. 610. – № 7931. – P. 381-388. DOI: 10.1038/s41586-022-05282-z.
449. Xia, H. Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2 / H. Xia, Z. Cao, X. Xie [et al.] // *Cell Reports*. – 2020. – Vol. 33. – № 1. – P. 108234. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108234.
450. Almazán, F. Coronavirus reverse genetic systems: infectious clones and replicons / F. Almazán, I. Sola, S. Zuñiga [et al.] // *Virus Research*. – 2014. – Vol. 189. – P. 262-270. DOI: 10.1016/j.virusres.2014.05.026.
451. Scobey, T. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus / T. Scobey, B.L. Yount, A.C. Sims [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – Vol. 110. – № 40. – P. 16157-16162. DOI: 10.1073/pnas.1311542110.
452. Yount, B. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus / B. Yount, K.M. Curtis, E.A. Fritz [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2003. – Vol. 100. – № 22. – P. 12995-13000. DOI: 10.1073/pnas.1735582100.
453. Yount, B. Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: transmissible gastroenteritis virus model / B. Yount, K.M. Curtis, R.S. Baric // *Journal of Virology*. – 2000. – Vol. 74. – № 22. – P. 10600-10611. DOI: 10.1128/jvi.74.22.10600-10611.2000.
454. Rice, C.M. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation / C.M. Rice, A. Grakoui, R. Galler, T.J. Chambers // *The New Biologist*. – 1989. – Vol. 1. – № 3. – P. 285-296.
455. Becker, M.M. Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice / M.M. Becker, R.L. Graham, E.F. Donaldson [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol. 105. – № 50. – P. 19944-19949. DOI: 10.1073/pnas.0808116105.
456. Xie, X. Engineering SARS-CoV-2 using a reverse genetic system / X. Xie, K.G. Lokugamage, X. Zhang [et al.] // *Nature Protocols*. – 2021. – Vol. 16. – № 3. – P. 1761-1784. DOI: 10.1038/s41596-021-00491-8.
457. Curtis, K.M. Heterologous gene expression from transmissible gastroenteritis virus replicon particles / K.M. Curtis, B. Yount, R.S. Baric // *Journal of Virology*. – 2002. – Vol. 76. – № 3. – P. 1422-1434. DOI: 10.1128/jvi.76.3.1422-1434.2002.
458. Yount, B. Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59 / B. Yount, M.R. Denison, S.R. Weiss, R.S. Baric // *Journal of Virology*. – 2002. – Vol. 76. – № 21. – P. 11065-11078. DOI: 10.1128/jvi.76.21.11065-11078.2002.



459. Johnson, B.A. Loss of furin cleavage site attenuates SARS-CoV-2 pathogenesis / B.A. Johnson, X. Xie, A.L. Bailey [et al.] // *Nature*. – 2021. – Vol. 591. – № 7849. – P. 293-299. DOI: 10.1038/s41586-021-03237-4.
460. Liu, S. Stable Cell Clones Harboring Self-Replicating SARS-CoV-2 RNAs for Drug Screen / S. Liu, C.-K. Chou, W.W. Wu [et al.] // *Journal of Virology*. – 2022. – Vol. 96. – № 6. – P. e0221621. DOI: 10.1128/jvi.02216-21.
461. Liu, Y. Delta spike P681R mutation enhances SARS-CoV-2 fitness over Alpha variant / Y. Liu, J. Liu, B.A. Johnson [et al.] // *Cell Reports*. – 2022. – Vol. 39. – № 7. – P. 110829. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.110829.
462. Plante, J.A. Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness / J.A. Plante, Y. Liu, J. Liu [et al.] // *Nature*. – 2021. – Vol. 592. – № 7852. – P. 116-121. DOI: 10.1038/s41586-020-2895-3.
463. Johnson, B.A. Nucleocapsid mutations in SARS-CoV-2 augment replication and pathogenesis / B.A. Johnson, Y. Zhou, K.G. Lokugamage [et al.] // *PLoS pathogens*. – 2022. – Vol. 18. – № 6. – P. e1010627. DOI: 10.1371/journal.ppat.1010627.
464. Muruato, A. Mouse-adapted SARS-CoV-2 protects animals from lethal SARS-CoV challenge / A. Muruato, M.N. Vu, B.A. Johnson [et al.] // *PLoS biology*. – 2021. – Vol. 19. – № 11. – P. e3001284. DOI: 10.1371/journal.pbio.3001284.
465. Xie, X. A nanoluciferase SARS-CoV-2 for rapid neutralization testing and screening of anti-infective drugs for COVID-19 / X. Xie, A.E. Muruato, X. Zhang [et al.] // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 5214. DOI: 10.1038/s41467-020-19055-7.
466. Kurhade, C. Neutralization of Omicron sublineages and Deltacron SARS-CoV-2 by three doses of BNT162b2 vaccine or BA.1 infection / C. Kurhade, J. Zou, H. Xia [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. – 2022. – Vol. 11. – № 1. – P. 1828-1832. DOI: 10.1080/22221751.2022.2099305.
467. Xia, H. Neutralization and durability of 2 or 3 doses of the BNT162b2 vaccine against Omicron SARS-CoV-2 / H. Xia, J. Zou, C. Kurhade [et al.] // *Cell Host & Microbe*. – 2022. – Vol. 30. – № 4. – P. 485-488.e3. DOI: 10.1016/j.chom.2022.02.015.
468. Zou, J. Cross-neutralization of Omicron BA.1 against BA.2 and BA.3 SARS-CoV-2 / J. Zou, C. Kurhade, H. Xia [et al.] // *Nature Communications*. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 2956. DOI: 10.1038/s41467-022-30580-5.
469. Zou, J. Neutralization against Omicron SARS-CoV-2 from previous non-Omicron infection / J. Zou, H. Xia, X. Xie [et al.] // *Nature Communications*. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 852. DOI: 10.1038/s41467-022-28544-w.

470. Fang, Y. An antibody that neutralizes SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 by binding to a conserved spike epitope outside the receptor binding motif / Y. Fang, P. Sun, X. Xie [et al.] // *Science Immunology*. – 2022. – Vol. 7. – № 76. – P. eabp9962. DOI: 10.1126/sciimmunol.abp9962.

471. Ku, Z. Engineering SARS-CoV-2 specific cocktail antibodies into a bispecific format improves neutralizing potency and breadth / Z. Ku, X. Xie, J. Lin [et al.] // *Nature Communications*. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 5552. DOI: 10.1038/s41467-022-33284-y.

472. Ku, Z. Molecular determinants and mechanism for antibody cocktail preventing SARS-CoV-2 escape / Z. Ku, X. Xie, E. Davidson [et al.] // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 469. DOI: 10.1038/s41467-020-20789-7.

473. Ku, Z. Nasal delivery of an IgM offers broad protection from SARS-CoV-2 variants / Z. Ku, X. Xie, P.R. Hinton [et al.] // *Nature*. – 2021. – Vol. 595. – № 7869. – P. 718-723. DOI: 10.1038/s41586-021-03673-2.

474. Rabdano, S. Safety and Immunogenicity of the Convacell® Recombinant N Protein COVID-19 Vaccine / S. Rabdano, E. Ruzanova, D. Makarov [et al.] // *Vaccines*. – 2024. – Vol. 12. – № 1. – P. 100. DOI: 10.3390/vaccines12010100.

475. Rabdano, S.O. Immunogenicity and In Vivo Protective Effects of Recombinant Nucleocapsid-Based SARS-CoV-2 Vaccine Convacell® / S.O. Rabdano, E.A. Ruzanova, I.V. Pletyukhina [et al.] // *Vaccines*. – 2023. – Vol. 11. – № 4. – P. 874. DOI: 10.3390/vaccines11040874.

476. Brown, B. Innate and Adaptive Immunity during SARS-CoV-2 Infection: Biomolecular Cellular Markers and Mechanisms / B. Brown, V. Ojha, I. Fricke [et al.] // *Vaccines*. – 2023. – Vol. 11. – № 2. – P. 408. DOI: 10.3390/vaccines11020408.

477. Shen, J. Innate and adaptive immunity to SARS-CoV-2 and predisposing factors / J. Shen, J. Fan, Y. Zhao [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1159326. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1159326.

478. Miteva, D. Mucosal COVID-19 vaccines: Risks, benefits and control of the pandemic / D. Miteva, M. Peshevska-Sekulovska, V. Snegarova [et al.] // *World Journal of Virology*. – 2022. – Vol. 11. – № 5. – P. 221-236. DOI: 10.5501/wjv.v11.i5.221.

479. Nouailles, G. Live-attenuated vaccine sCPD9 elicits superior mucosal and systemic immunity to SARS-CoV-2 variants in hamsters / G. Nouailles, J.M. Adler, P. Pennitz [et al.] // *Nature Microbiology*. – 2023. – Vol. 8. – № 5. – P. 860-874. DOI: 10.1038/s41564-023-01352-8.

480. Mateus, J. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans / J. Mateus, A. Grifoni, A. Tarke [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. – 2020. – Vol. 370. – № 6512. – P. 89-94. DOI: 10.1126/science.abd3871.

481. Zhao, J. SARS-CoV-2 specific memory T cell epitopes identified in COVID-19-recovered subjects / J. Zhao, L. Wang, M. Schank [et al.] // *Virus Research*. – 2021. – Vol. 304. – P. 198508. DOI: 10.1016/j.virusres.2021.198508.
482. Sette, A. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19 / A. Sette, S. Crotty // *Cell*. – 2021. – Vol. 184. – № 4. – P. 861-880. DOI: 10.1016/j.cell.2021.01.007.
483. Tarke, A. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases / A. Tarke, J. Sidney, C.K. Kidd [et al.] // *Cell Reports. Medicine*. – 2021. – Vol. 2. – № 2. – P. 100204. DOI: 10.1016/j.xcrm.2021.100204.
484. Nian, X. Development of Nasal Vaccines and the Associated Challenges / X. Nian, J. Zhang, S. Huang [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – № 10. – P. 1983. DOI: 10.3390/pharmaceutics14101983.
485. Alu, A. Intranasal COVID-19 vaccines: From bench to bed / A. Alu, L. Chen, H. Lei [et al.] // *EBioMedicine*. – 2022. – Vol. 76. – P. 103841. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.103841.
486. Di Pietrantonj, C. Vaccines for measles, mumps, rubella, and varicella in children / C. Di Pietrantonj, A. Rivetti, P. Marchione [et al.] // *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2021. – Vol. 11. – № 11. – P. CD004407. DOI: 10.1002/14651858.CD004407.pub5.
487. Ma, S.-J. Combination Measles-Mumps-Rubella-Varicella Vaccine in Healthy Children: A Systematic Review and Meta-analysis of Immunogenicity and Safety / S.-J. Ma, X. Li, Y.-Q. Xiong [et al.] // *Medicine*. – 2015. – Vol. 94. – № 44. – P. e1721. DOI: 10.1097/MD.0000000000001721.
488. Trimpert, J. Live attenuated virus vaccine protects against SARS-CoV-2 variants of concern B.1.1.7 (Alpha) and B.1.351 (Beta) / J. Trimpert, J.M. Adler, K. Eschke [et al.] // *Science Advances*. – 2021. – Vol. 7. – № 49. – P. eabk0172. DOI: 10.1126/sciadv.abk0172.
489. Deng, L. Risk of SARS-CoV-2 reinfection: a systematic review and meta-analysis / L. Deng, P. Li, X. Zhang [et al.] // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 20763. DOI: 10.1038/s41598-022-24220-7.
490. Mao, Y. Reinfection rates among patients previously infected by SARS-CoV-2: systematic review and meta-analysis / Y. Mao, W. Wang, J. Ma [et al.] // *Chinese Medical Journal*. – 2021. – Vol. 135. – № 2. – P. 145-152. DOI: 10.1097/CM9.0000000000001892.
491. Altarawneh, H.N. Protection against the Omicron Variant from Previous SARS-CoV-2 Infection / H.N. Altarawneh, H. Chemaitelly, M.R. Hasan [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2022. – Vol. 386. – № 13. – P. 1288-1290. DOI: 10.1056/NEJMc2200133.
492. Chemaitelly, H. Duration of immune protection of SARS-CoV-2 natural infection against reinfection / H. Chemaitelly, N. Nagelkerke, H.H. Ayoub [et al.] // *Journal of Travel Medicine*. – 2022. – Vol. 29. – № 8. – P. taac109. DOI: 10.1093/jtm/taac109.

493. Ma, J. A Heterologous Challenge Rescues the Attenuated Immunogenicity of SARS-CoV-2 Omicron BA.1 Variant in Syrian Hamster Model / J. Ma, X. Liu, M. Zhou [et al.] // *Journal of Virology*. – 2023. – Vol. 97. – № 2. – P. e0168422. DOI: 10.1128/jvi.01684-22.

494. Codagenix, Inc. First-in-human, Randomised, Double-blind, Placebo-controlled, Dose-escalation Study in Healthy Young Adults Evaluating the Safety and Immunogenicity of COVI-VAC, a Live Attenuated Vaccine Candidate for Prevention of COVID-19. / Codagenix, Inc. – [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov), 2022. – Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04619628> (дата обращения: 18.10.2024). – [Электронный ресурс].

495. Home. – Mode of access: <https://codagenix.com/> (date of access: 18.10.2024). – [Electronic resource].

496. Зверев, В.В. Лабораторная характеристика ослабленных вариантов отечественных штаммов вируса краснухи, адаптированных к культуре клеток Vero. / В.В. Зверев, Р.Г. Десяткова, Н.В. Юминова [и др.] // *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. – 2008. – Т. 4. – № 41.

497. Davies, H.W. The use of a continuous cell line for the isolation of influenza viruses / H.W. Davies, G. Appleyard, P. Cunningham, M.S. Pereira // *Bulletin of the World Health Organization*. – 1978. – Vol. 56. – № 6. – P. 991-993.

498. Gorphe, P. A comprehensive review of Hep-2 cell line in translational research for laryngeal cancer / P. Gorphe // *American journal of cancer research*. – 2019. – Vol. 9. – № 4. – P. 644-649.

499. Ammour, Y. Quantification of measles, mumps and rubella viruses using real-time quantitative TaqMan-based RT-PCR assay / Y. Ammour, E. Faizuloev, T. Borisova, A. Nikonova, G. Dmitriev, S. Lobodanov, V. Zverev // *Journal of Virological Methods*. – 2013. – Vol. 187. – № 1. – P. 57-64. DOI: 10.1016/j.jviromet.2012.09.011.

500. Froussard, P. rPCR: a powerful tool for random amplification of whole RNA sequences / P. Froussard // *PCR methods and applications*. – 1993. – Vol. 2. – rPCR. – № 3. – P. 185-190. DOI: 10.1101/gr.2.3.185.

501. Reed L.J. A simple method of estimating fifty percent endpoints / Reed L.J., Muench H. // *American Journal of Epidemiology*. – 1938. – Vol. 27. – № 3. – P. 493-497. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.

502. Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula / R. Ma. – [Electronic resource] // *World journal of virology*. – 2016. – Vol. 5. – № 2. – Mode of access: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27175354/> (date of access: 18.09.2024).

503. Fogel, A. Markers of Rubella Virus Strains in RK13 Cell Culture / A. Fogel, S.A. Plotkin // *Journal of Virology*. – 1969. – Vol. 3. – № 2. – P. 157-163.

504. Altschul, S.F. Basic local alignment search tool / S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 1990. – Vol. 215. – № 3. – P. 403-410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
505. Boom, R. Rapid and simple method for purification of nucleic acids / R. Boom, C.J. Sol, M.M. Salimans [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1990. – Vol. 28. – № 3. – P. 495-503. DOI: 10.1128/jcm.28.3.495-503.1990.
506. Chan, J.F.-W. Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/HeI Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens / J.F.-W. Chan, C.C.-Y. Yip, K.K.-W. To [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2020. – Vol. 58. – № 5. – P. e00310-20. DOI: 10.1128/JCM.00310-20.
507. Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol. 1 / Sambrook, J., Russell, D.W. – 3. – New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
508. Gaunt, E.R. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method / E.R. Gaunt, A. Hardie, E.C.J. Claas [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2010. – Vol. 48. – № 8. – P. 2940-2947. DOI: 10.1128/JCM.00636-10.
509. bioinformatics/py/classificationStat.py at master · lioj/bioinformatics. – Mode of access: <https://github.com/lioj/bioinformatics/blob/master/py/classificationStat.py> (date of access: 18.10.2024). – [Electronic resource].
510. Li, H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences / H. Li // *Bioinformatics* (Oxford, England). – 2018. – Vol. 34. – № 18. – P. 3094-3100. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty191.
511. bioinformatics/py/bam2consensus.py at master · lioj/bioinformatics. – Mode of access: <https://github.com/lioj/bioinformatics/blob/master/py/bam2consensus.py> (date of access: 18.10.2024). – [Electronic resource].
512. Reiling, S. SARS-CoV-2 McGill Nanopore sequencing protocol SuperScript IV\_42C\_ArticV3 / S. Reiling, S.-H. Chen, A.-M. Roy [et al.]. – [Electronic resource]. – 2020. – Mode of access: <https://www.protocols.io/view/sars-cov-2-mcgill-nanopore-sequencing-protocol-sup-bjajkicn> (date of access: 10.01.2025).
513. Tamura, K. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 / K. Tamura, G. Stecher, S. Kumar // *Molecular Biology and Evolution*. – 2021. – Vol. 38. – № 7. – P. 3022-3027. DOI: 10.1093/molbev/msab120.
514. Gao, Q. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2 / Q. Gao, L. Bao, H. Mao [et al.] // *Science* (New York, N.Y.). – 2020. – Vol. 369. – № 6499. – P. 77-81. DOI: 10.1126/science.abc1932.

515. Gruber, A.D. Standardization of Reporting Criteria for Lung Pathology in SARS-CoV-2-infected Hamsters: What Matters? / A.D. Gruber, N. Osterrieder, L.D. Bertzbach [et al.] // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2020. – Vol. 63. – № 6. – P. 856-859. DOI: 10.1165/rcmb.2020-0280LE.

516. Current ICTV Taxonomy Release | ICTV. – Режим доступа: <https://ictv.global/taxonomy> (дата обращения: 16.01.2025). – [Электронный ресурс].

517. Templeton, K.E. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4 / K.E. Templeton, S.A. Scheltinga, M.F.C. Beersma [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2004. – Vol. 42. – № 4. – P. 1564-1569. DOI: 10.1128/JCM.42.4.1564-1569.2004.

518. Witsø, E. High prevalence of human enterovirus A infections in natural circulation of human enteroviruses / E. Witsø, G. Palacios, O. Cinek [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2006. – Vol. 44. – № 11. – P. 4095-4100. DOI: 10.1128/JCM.00653-06.

519. Yoshida, T. Characterization of sapoviruses detected in gastroenteritis outbreaks and identification of asymptomatic adults with high viral load / T. Yoshida, S. Kasuo, Y. Azegami [et al.] // *Journal of Clinical Virology*. – 2009. – Vol. 45. – № 1. – P. 67-71. DOI: 10.1016/j.jcv.2009.03.003.

520. Mihala, G. Potentially Pathogenic Organisms in Stools and Their Association With Acute Diarrheal Illness in Children Aged <2 Years / G. Mihala, R.S. Ware, S.B. Lambert [et al.] // *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. – 2022. – Vol. 11. – № 5. – P. 199-206. DOI: 10.1093/jpids/piab130.

521. Лободанов, С.А. Оценка эффективности дифференциальной диагностики гриппа методом мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени. / С.А. Лободанов, А.А. Никонова, Е.Б. Файзулов, С.В. Трушакова, Ю.И. Забияка, М.А. Калинкина, В.Т. Иванова, Е.С. Шевченко, В.В. Зверев, Е.И. Бурцева // *Вопросы вирусологии*. – 2012. – Т. 57. – № 1. – С. 42-45.

522. Марова, А.А. Опыт применения метода мультиплексной ПЦР-РВ для дифференциальной диагностики кишечных вирусных инфекций. / А.А. Марова, А.С. Оксанич, А.Н. Каира, Е.Р. Мескина, Е.А. Медведева, О.Е. Иванова, А.Н. Лукашев, К.К. Кюрегян, М.А. Калинкина, О.В. Егорова, В.В. Зверев, Е.Б. Файзулов // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2012. – № 6. – С. 39-45.

523. Никонова, А.А. Применение метода мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени для дифференциальной диагностики респираторных вирусных инфекций / А.А. Никонова, Е.С. Успенская, С.А. Лободанов, А.С. Оксанич, А.Е. Горбаленя, Е.С.И. Claas, Е.П. Фошина, А.Н. Каира, В.В. Зверев, Е.Б. Файзулов // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2009. – № 1. – С. 67-70.

524. Оксанич, А.С. Мультиплексная ПЦР в режиме реального времени для быстрого выявления энтеровирусов, аденовирусов и вируса гепатита А в клинических образцах. / А.С. Оксанич, Е.Б. Файзулов, А.А. Никонова, В.И. Каширин, В.Д. Лотте, О.Е. Иванова, В.В. Зверев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2007. – № 5. – С. 65-70.

525. Файзулов, Е.Б. Разработка ПЦР тест-системы для выявления аденовирусной инфекции у человека. / Е.Б. Файзулов, А.А. Никонова, А.С. Оксанич, А.С. Борисенко, В.В. Зверев // Вопросы вирусологии. – 2005. – № 6. – С. 44-47.

526. Файзулов Е.Б. Дифференциальная диагностика ОРВИ методом мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени. / Файзулов Е.Б., Лободанов С.А., Никонова А.А. [и др.] // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2012. – № 1. – С. 12-19.

527. Bae, H.-G. Detection of yellow fever virus: a comparison of quantitative real-time PCR and plaque assay / H.-G. Bae, A. Nitsche, A. Teichmann [et al.] // Journal of Virological Methods. – 2003. – Vol. 110. – № 2. – P. 185-191. DOI: 10.1016/s0166-0934(03)00129-0.

528. Youil, R. Comparative study of influenza virus replication in Vero and MDCK cell lines / R. Youil, Q. Su, T.J. Toner [et al.] // Journal of Virological Methods. – 2004. – Vol. 120. – № 1. – P. 23-31. DOI: 10.1016/j.jviromet.2004.03.011.

529. Garcia, S. Quantitative real-time PCR detection of Rift Valley fever virus and its application to evaluation of antiviral compounds / S. Garcia, J.M. Crance, A. Billecocq [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2001. – Vol. 39. – № 12. – P. 4456-4461. DOI: 10.1128/JCM.39.12.4456-4461.2001.

530. Забияка, Ю.И. Экспресс-метод оценки титра вируса краснухи в вирусосодержащей жидкости с помощью ПЦР-РВ / Ю.И. Забияка, Е.Б. Файзулов, Т.К. Борисова, А.А. Никонова, В.В. Зверев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – № 5. – С. 57-62.

531. Troeger, C. Rotavirus Vaccination and the Global Burden of Rotavirus Diarrhea Among Children Younger Than 5 Years / C. Troeger, I.A. Khalil, P.C. Rao [et al.] // JAMA pediatrics. – 2018. – Vol. 172. – № 10. – P. 958-965. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2018.1960.

532. Jennings, M.C. Supporting evidence-based rotavirus vaccine introduction decision-making and implementation: Lessons from 8 Gavi-eligible countries / M.C. Jennings, M. Sauer, C. Manchester [et al.] // Vaccine. – 2024. – Vol. 42. – № 1. – P. 8-16. DOI: 10.1016/j.vaccine.2023.11.035.

533. Коровкин А.С. Результаты и перспективы вакцинопрофилактики ротавирусной инфекции в Российской Федерации / Коровкин А.С., Игнатьев Г.М. // БИОпрепараты. – 2023. – Т. 23. – № 4. – С. 499-512.

534. Hoog, M.L.A. de. Report of the 5th European expert meeting on rotavirus vaccination (EEROVAC) / M.L.A. de Hoog, T. Vesikari, C. Giaquinto [et al.] // Human Vaccines &

Immunotherapeutics. – 2018. – Vol. 14. – № 4. – P. 1027-1034. DOI: 10.1080/21645515.2017.1412019.

535. Бахтояров, Г.Н. Определение генетической структуры ротавирусов группы А, циркулирующих в Московском регионе, методом ПЦР в режиме реального времени. / Г.Н. Бахтояров, С.А. Лободанов, А.А. Марова, Е.Р. Мескина, В.В. Зверев, Е.Б. Файзулов // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2012. – № 6. – С. 35-39.

536. Бахтояров, Г.Н. Оценка эффективности применения мультиплексной ПЦР в режиме реального времени для генотипирования ротавирусов группы А / Г.Н. Бахтояров, И.С. Киселев, В.В. Зверев, Е.Б. Файзулов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. – № 4. – С. 43-49.

537. Simmonds, M.K. New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: Strategies for typing previously untypeable strains / M.K. Simmonds, G. Armah, R. Asmah [et al.] // Journal of Clinical Virology. – 2008. – Vol. 42. – № 4. – P. 368-373. DOI: 10.1016/j.jcv.2008.02.011.

538. Solberg, O.D. Characterization of novel VP7, VP4, and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus / O.D. Solberg, M.E. Hasing, G. Trueba, J.N.S. Eisenberg // Virology. – 2009. – Vol. 385. – № 1. – P. 58-67. DOI: 10.1016/j.virol.2008.11.026.

539. Croville, G. Rapid whole-genome based typing and surveillance of avipoxviruses using nanopore sequencing / G. Croville, G. Le Loc'h, C. Zanchetta [et al.] // Journal of Virological Methods. – 2018. – Vol. 261. – P. 34-39. DOI: 10.1016/j.jviromet.2018.08.003.

540. Li, K.K. Direct Nanopore Sequencing of Human Cytomegalovirus Genomes from High-Viral-Load Clinical Samples / K.K. Li, B. Lau, N.M. Suárez [et al.] // Viruses. – 2023. – Vol. 15. – № 6. – P. 1248. DOI: 10.3390/v15061248.

541. Maes, M. Multiplex MinION sequencing suggests enteric adenovirus F41 genetic diversity comparable to pre-COVID-19 era / M. Maes, F. Khokhar, S.A.J. Wilkinson [et al.] // Microbial Genomics. – 2023. – Vol. 9. – № 1. – P. mgen000920. DOI: 10.1099/mgen.0.000920.

542. Chan, C.-H. Amplification of the entire genome of influenza A virus H1N1 and H3N2 subtypes by reverse-transcription polymerase chain reaction / C.-H. Chan, K.-L. Lin, Y. Chan [et al.] // Journal of Virological Methods. – 2006. – Vol. 136. – № 1-2. – P. 38-43. DOI: 10.1016/j.jviromet.2006.03.027.

543. Inoue, E. Full genomic amplification and subtyping of influenza A virus using a single set of universal primers / E. Inoue, X. Wang, Y. Osawa, K. Okazaki // Microbiology and Immunology. – 2010. – Vol. 54. – № 3. – P. 129-134. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2009.00193.x.

544. Rutvisuttinunt, W. Simultaneous and complete genome sequencing of influenza A and B with high coverage by Illumina MiSeq Platform / W. Rutvisuttinunt, P. Chinnawirotpisan, S.



Simasathien [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2013. – Vol. 193. – № 2. – P. 394-404. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.07.001.

545. Matthijnssens, J. Simian rotaviruses possess divergent gene constellations that originated from interspecies transmission and reassortment / J. Matthijnssens, Z.F. Taraporewala, H. Yang [et al.] // *Journal of Virology*. – 2010. – Vol. 84. – № 4. – P. 2013-2026. DOI: 10.1128/JVI.02081-09.

546. Phan, M.V.T. Unbiased whole-genome deep sequencing of human and porcine stool samples reveals circulation of multiple groups of rotaviruses and a putative zoonotic infection / M.V.T. Phan, P.H. Anh, N.V. Cuong [et al.] // *Virus Evolution*. – 2016. – Vol. 2. – № 2. – P. vew027. DOI: 10.1093/ve/vew027.

547. Sarkar, S. Outbreak of diarrhoea in piglets caused by novel rotavirus genotype G4P[49] in north-western district of Bangladesh, February 2014 / S. Sarkar, M.D. Esona, R. Gautam [et al.] // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2020. – Vol. 67. – № 1. – P. 442-449. DOI: 10.1111/tbed.13343.

548. Zhou, X. Genomic characterization of G3P[6], G4P[6] and G4P[8] human rotaviruses from Wuhan, China: Evidence for interspecies transmission and reassortment events / X. Zhou, Y.-H. Wang, S. Ghosh [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2015. – Vol. 33. – P. 55-71. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.04.010.

549. Nakamura, S. Direct metagenomic detection of viral pathogens in nasal and fecal specimens using an unbiased high-throughput sequencing approach / S. Nakamura, C.-S. Yang, N. Sakon [et al.] // *PloS One*. – 2009. – Vol. 4. – № 1. – P. e4219. DOI: 10.1371/journal.pone.0004219.

550. Petersen, L.M. Third-Generation Sequencing in the Clinical Laboratory: Exploring the Advantages and Challenges of Nanopore Sequencing / L.M. Petersen, I.W. Martin, W.E. Moschetti [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2019. – Vol. 58. – № 1. – P. e01315-19. DOI: 10.1128/JCM.01315-19.

551. Dóró, R. Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control / R. Dóró, S.L. Farkas, V. Martella, K. Bányai // *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. – 2015. – Vol. 13. – № 11. – P. 1337-1350. DOI: 10.1586/14787210.2015.1089171.

552. Salamunova, S. Genetic variability of pig and human rotavirus group A isolates from Slovakia / S. Salamunova, A. Jackova, T. Csank [et al.] // *Archives of Virology*. – 2020. – Vol. 165. – № 2. – P. 463-470. DOI: 10.1007/s00705-019-04504-6.

553. Velasquez, D.E. Evolution of P[8], P[4], and P[6] VP8\* genes of human rotaviruses globally reported during 1974 and 2017: possible implications for rotavirus vaccines in development / D.E. Velasquez, B. Jiang // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2019. – Vol. 15. – № 12. – P. 3003-3008. DOI: 10.1080/21645515.2019.1619400.

554. Hungerford, D. Rotavirus vaccine impact and socioeconomic deprivation: an interrupted time-series analysis of gastrointestinal disease outcomes across primary and secondary care in the UK / D. Hungerford, R. Vivancos, J.M. Read [et al.] // *BMC medicine*. – 2018. – Vol. 16. – № 1. – P. 10. DOI: 10.1186/s12916-017-0989-z.

555. WHO. Global Rotavirus Information and Surveillance Bulletin. 2011.

556. Dennehy, P.H. Viral gastroenteritis in children / P.H. Dennehy // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2011. – Vol. 30. – № 1. – P. 63-64. DOI: 10.1097/INF.0b013e3182059102.

557. Leshem, E. Acute gastroenteritis hospitalizations among US children following implementation of the rotavirus vaccine / E. Leshem, J.E. Tate, C.A. Steiner [et al.] // *JAMA*. – 2015. – Vol. 313. – № 22. – P. 2282-2284. DOI: 10.1001/jama.2015.5571.

558. O’Ryan, M. Human rotavirus vaccine (Rotarix): focus on effectiveness and impact 6 years after first introduction in Africa / M. O’Ryan, C. Giaquinto, B. Benninghoff // *Expert Review of Vaccines*. – 2015. – Vol. 14. – № 8. – P. 1099-1112. DOI: 10.1586/14760584.2015.1059282.

559. Tam, C.C. Changes in causes of acute gastroenteritis in the United Kingdom over 15 years: microbiologic findings from 2 prospective, population-based studies of infectious intestinal disease / C.C. Tam, S.J. O’Brien, D.S. Tompkins [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2012. – Vol. 54. – № 9. – P. 1275-1286. DOI: 10.1093/cid/cis028.

560. Bruijning-Verhagen, P. Nosocomial rotavirus infections: a meta-analysis / P. Bruijning-Verhagen, C. Quach, M. Bonten // *Pediatrics*. – 2012. – Vol. 129. – № 4. – P. e1011-1019. DOI: 10.1542/peds.2011-2779.

561. Kambhampati, A. Burden of norovirus in healthcare facilities and strategies for outbreak control / A. Kambhampati, M. Koopmans, B.A. Lopman // *The Journal of Hospital Infection*. – 2015. – Vol. 89. – № 4. – P. 296-301. DOI: 10.1016/j.jhin.2015.01.011.

562. Ревич, Б.А. Оценка опасности для здоровья населения Москвы высокой температуры и загрязнения атмосферного воздуха / Б.А. Ревич, Д.В. Шапошников, С.Л. Авалиани [и др.] // *Гигиена и санитария*. – 2015. – Т. 94. – № 1. – С. 36-40.

563. Mayindou, G. Molecular epidemiology and surveillance of circulating rotavirus and adenovirus in Congolese children with gastroenteritis / G. Mayindou, B. Ngokana, A. Sidibé [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2016. – Vol. 88. – № 4. – P. 596-605. DOI: 10.1002/jmv.24382.

564. Omere, R. Epidemiology, Seasonality and Factors Associated with Rotavirus Infection among Children with Moderate-to-Severe Diarrhea in Rural Western Kenya, 2008-2012: The Global Enteric Multicenter Study (GEMS) / R. Omere, J.E. Tate, C.E. O’Reilly [et al.] // *PloS One*. – 2016. – Vol. 11. – № 8. – P. e0160060. DOI: 10.1371/journal.pone.0160060.

565. Abdel-Haq, N. Rotavirus infections in Detroit, USA, a region of low vaccine prevalence / N. Abdel-Haq, M. Amjad, E. McGrath [et al.] // *Virusdisease*. – 2016. – Vol. 27. – № 2. – P. 179-182. DOI: 10.1007/s13337-016-0309-9.
566. Shim, J.O. Changing distribution of age, clinical severity, and genotypes of rotavirus gastroenteritis in hospitalized children after the introduction of vaccination: a single center study in Seoul between 2011 and 2014 / J.O. Shim, J.Y. Chang, S. Shin [et al.] // *BMC infectious diseases*. – 2016. – Vol. 16. – P. 287. DOI: 10.1186/s12879-016-1623-y.
567. Afrad, M.H. Changing profile of rotavirus genotypes in Bangladesh, 2006-2012 / M.H. Afrad, Z. Hassan, S. Farjana [et al.] // *BMC infectious diseases*. – 2013. – Vol. 13. – P. 320. DOI: 10.1186/1471-2334-13-320.
568. Pitzer, V.E. Did Large-Scale Vaccination Drive Changes in the Circulating Rotavirus Population in Belgium? / V.E. Pitzer, J. Bilcke, E. Heylen [et al.] // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 18585. DOI: 10.1038/srep18585.
569. Lobzin, Y.V. Burden of Childhood Rotavirus Disease in the Outpatient Setting of the Russian Federation / Y.V. Lobzin, S.M. Kharit, M.G. Goveia [et al.] // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2017. – Vol. 36. – № 5. – P. 472-476. DOI: 10.1097/INF.0000000000001472.
570. Sashina, T.A. Predominance of new G9P[8] rotaviruses closely related to Turkish strains in Nizhny Novgorod (Russia) / T.A. Sashina, O.V. Morozova, N.V. Epifanova, N.A. Novikova // *Archives of Virology*. – 2017. – Vol. 162. – № 8. – P. 2387-2392. DOI: 10.1007/s00705-017-3364-7.
571. Cowley, D. Emergence of a novel equine-like G3P[8] inter-genogroup reassortant rotavirus strain associated with gastroenteritis in Australian children / D. Cowley, C.M. Donato, S. Roczo-Farkas, C.D. Kirkwood // *The Journal of General Virology*. – 2016. – Vol. 97. – № 2. – P. 403-410. DOI: 10.1099/jgv.0.000352.
572. Arana, A. Emergence and spread of G3P[8] rotaviruses possessing an equine-like VP7 and a DS-1-like genetic backbone in the Basque Country (North of Spain), 2015 / A. Arana, M. Montes, K.C. Jere [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2016. – Vol. 44. – P. 137-144. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.06.048.
573. Dóro, R. Equine-like G3 rotavirus in Hungary, 2015 - Is it a novel intergenogroup reassortant pandemic strain? / R. Dóro, S. Marton, A.H. Bartókné [et al.] // *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica*. – 2016. – Vol. 63. – № 2. – P. 243-255. DOI: 10.1556/030.63.2016.2.8.
574. Guerra, S.F.S. Detection of a novel equine-like G3 rotavirus associated with acute gastroenteritis in Brazil / S.F.S. Guerra, L.S. Soares, P.S. Lobo [et al.] // *The Journal of General Virology*. – 2016. – Vol. 97. – № 12. – P. 3131-3138. DOI: 10.1099/jgv.0.000626.

575. Komoto, S. Emergence and Characterization of Unusual DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains in Children with Diarrhea in Thailand / S. Komoto, R. Tacharoenmuang, R. Guntapong [et al.] // *PloS One*. – 2015. – Vol. 10. – № 11. – P. e0141739. DOI: 10.1371/journal.pone.0141739.

576. Yuzhakov, A. Prevalence and Genetic Diversity of Group A Rotavirus Genotypes in Moscow (2019-2020) / A. Yuzhakov, K. Yuzhakova, N. Kulikova [et al.] // *Pathogens (Basel, Switzerland)*. – 2021. – Vol. 10. – № 6. – P. 674. DOI: 10.3390/pathogens10060674.

577. Ivashechkin, A.A. Genetic diversity of group A rotaviruses in Moscow in 2018-2019 / A.A. Ivashechkin, A.G. Yuzhakov, T.V. Grebennikova [et al.] // *Archives of Virology*. – 2020. – Vol. 165. – № 3. – P. 691-702. DOI: 10.1007/s00705-020-04534-5.

578. Новикова, Н.А. Проявления эпидемического процесса ротавирусной инфекции в Нижнем Новгороде в предвакцинальный период / Н.А. Новикова, Т.А. Сашина, Л.А. Солнцев [и др.] // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2017. – Т. 94. – № 5. – С. 46-52. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-5-46-52.

579. Denisyuk, N.B. Genetic characteristics of group A rotaviruses circulating in the Orenburg region during various epidemic seasons / N.B. Denisyuk // *Journal Infectology*. – 2021. – Vol. 13. – № 3. – P. 82-91. DOI: 10.22625/2072-6732-2021-13-3-82-91.

580. Мескина, Е.Р. Сравнительная характеристика гастроэнтерита, вызванного ротавирусами генотипов G4P[8] и G9P[8], у детей, госпитализированных в стационар г. Москвы (эпидсезон 2012–2013 гг.) / Е.Р. Мескина, А.Ю. Ушакова, Е.Б. Файзулов, Г.Н. Бахтояров, В.В. Киселева // *Инфекционные болезни*. – 2017. – Т. 15. – № 1. – С. 23-28. DOI: 10.20953/1729-9225-2017-1-23-28.

581. Fujii, Y. Molecular Characteristics of Novel Mono-Reassortant G9P[8] Rotavirus A Strains Possessing the NSP4 Gene of the E2 Genotype Detected in Tokyo, Japan / Y. Fujii, M. Oda, Y. Somura, T. Shinkai // *Japanese Journal of Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 73. – № 1. – P. 26-35. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2019.211.

582. Katz, E.M. Whole-gene analysis of inter-genogroup reassortant rotaviruses from the Dominican Republic: Emergence of equine-like G3 strains and evidence of their reassortment with locally-circulating strains / E.M. Katz, M.D. Esona, N.S. Betrapally [et al.] // *Virology*. – 2019. – Vol. 534. – P. 114-131. DOI: 10.1016/j.virol.2019.06.007.

583. McDonald, S.M. Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment with preferred genome constellations / S.M. McDonald, J. Matthijnsens, J.K. McAllen [et al.] // *PLoS pathogens*. – 2009. – Vol. 5. – № 10. – P. e1000634. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000634.

584. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 году: Государственный доклад. Москва: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2024. – 364 с.

585. Morozova, O.V. Phylodynamic characteristics of reassortant DS-1-like G3P[8]-strains of rotavirus type A isolated in Nizhny Novgorod (Russia) / O.V. Morozova, T.A. Sashina, N.V. Epifanova [et al.] // *Brazilian Journal of Microbiology*: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]. – 2023. – Vol. 54. – № 4. – P. 2867-2877. DOI: 10.1007/s42770-023-01155-3.

586. Sashina, T.A. Detection and full-genotype determination of rare and reassortant rotavirus A strains in Nizhny Novgorod in the European part of Russia / T.A. Sashina, E.I. Velikzhanina, O.V. Morozova [et al.] // *Archives of Virology*. – 2023. – Vol. 168. – № 8. – P. 215. DOI: 10.1007/s00705-023-05838-y.

587. Старикова, П.К. Молекулярно-генетический мониторинг ротавирусов группы А, циркулировавших в Уральском федеральном округе в 2023 г. / П.К. Старикова, Т.М. Итани // *Материалы XVI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены*. – Екатеринбург : ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, 2024. – С. 98-99.

588. Esona, M.D. Novel human rotavirus genotype G5P[7] from child with diarrhea, Cameroon / M.D. Esona, A. Geyer, K. Banyai [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2009. – Vol. 15. – № 1. – P. 83-86. DOI: 10.3201/eid1501.080899.

589. Wang, Y.-H. Full genomic analysis of a porcine-bovine reassortant G4P[6] rotavirus strain R479 isolated from an infant in China / Y.-H. Wang, N. Kobayashi, S. Nagashima [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2010. – Vol. 82. – № 6. – P. 1094-1102. DOI: 10.1002/jmv.21760.

590. Zeller, M. Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq / M. Zeller, J.T. Patton, E. Heylen [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2012. – Vol. 50. – № 3. – P. 966-976. DOI: 10.1128/JCM.05590-11.

591. Imagawa, T. Genetic diversity of species A rotaviruses detected in clinical and environmental samples, including porcine-like rotaviruses from hospitalized children in the Philippines / T. Imagawa, M. Saito, D. Yamamoto [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2020. – Vol. 85. – P. 104465. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104465.

592. Papp, H. Zoonotic transmission of reassortant porcine G4P[6] rotaviruses in Hungarian pediatric patients identified sporadically over a 15 year period / H. Papp, R. Borzák, S. Farkas [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2013. – Vol. 19. – P. 71-80. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.06.013.

593. Каира, А.Н. Эпидемиологические тенденции заболеваемости и вопросы вакцинопрофилактики ротавирусной инфекции на современном этапе / А.Н. Каира, Е.Б. Файзулов, В.Ф. Лавров, О.А. Свитич, Т.В. Соломай, А.А. Никонова, О.А. Петруша // *Санитарный врач*. – 2020. – № 6. – С. 17-29. DOI: 10.33920/med-08-2006-02.

594. Петруша О.А. Молекулярно-генетические особенности ротавирусов группы А, выявленных в Москве в 2015–2020 гг. / О.А. Петруша, Е.Р. Корчевая, Р.Р. Минтаев, И.Ю. Исаков, А.А. Никонова, Е.Р. Мескина, А.Ю. Ушакова, М.К. Хадисова, В.В. Зверев, Е.Б. Файзулов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2022. – Т. 99. – № 1. – С. 7-19.
595. Филатов, Н.Н. Некоторые особенности проявлений эпидемического процесса при острых кишечных инфекциях в городе Москве / Н.Н. Филатов, А.В. Линок, Е.Б. Файзулов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2016. – № 1. – С. 7-21.
596. Kisseljova, N. Detection of Human Papillomavirus Prevalence in Ovarian Cancer by Different Test Systems / N. Kisseljova, K. Zhordania, M. Fedorova [et al.] // Intervirology. – 2019. – Vol. 62. – № 5-6. – P. 198-204. DOI: 10.1159/000506050.
597. Kulmala, S.-M.A. Prevalence of the most common high-risk HPV genotypes among women in three new independent states of the former Soviet Union / S.-M.A. Kulmala, I.P. Shabalova, N. Petrovitchev [et al.] // Journal of Medical Virology. – 2007. – Vol. 79. – № 6. – P. 771-781. DOI: 10.1002/jmv.20839.
598. Roik, E. Sociodemographic characteristics, sexual behaviour and knowledge about cervical cancer prevention as risk factors for high-risk human papillomavirus infection in Arkhangelsk, North-West Russia / E. Roik, E. Sharashova, O. Kharkova [et al.] // International Journal of Circumpolar Health. – 2018. – Vol. 77. – № 1. – P. 1498681. DOI: 10.1080/22423982.2018.1498681.
599. Smelov, V. Determinants of the presence of human papillomaviruses in the anal canal of Russian men / V. Smelov, K.M. Elfström, C. Eklund [et al.] // Journal of Medical Virology. – 2018. – Vol. 90. – № 10. – P. 1643-1650. DOI: 10.1002/jmv.25234.
600. Донников, А.Е. Анализ распространенности и вирусной нагрузки различных типов вируса папилломы человека в регионах Российской Федерации / А.Е. Донников, М.И. Маркелов, Т.Ю. Пестрикова [и др.] // Акушерство и Гинекология. – 2019. – № 4. – С. 39-47. DOI: 10.18565/aig.2019.4.39-47.
601. Cohen, D.A. When and where do youths have sex? The potential role of adult supervision / D.A. Cohen, T.A. Farley, S.N. Taylor [et al.] // Pediatrics. – 2002. – Vol. 110. – № 6. – P. e66. DOI: 10.1542/peds.110.6.e66.
602. Bosch, F.X. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia / F.X. Bosch, A.N. Burchell, M. Schiffman [et al.] // Vaccine. – 2008. – Vol. 26 Suppl 10. – P. K1-16. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.05.064.
603. Lopalco, P.L. Spotlight on the 9-valent HPV vaccine / P.L. Lopalco // Drug Design, Development and Therapy. – 2017. – Vol. 11. – P. 35-44. DOI: 10.2147/DDDT.S91018.

604. Sanjose, S. de. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study / S. de Sanjose, W.G. Quint, L. Alemany [et al.] // *The Lancet. Oncology*. – 2010. – Vol. 11. – № 11. – P. 1048-1056. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70230-8.
605. Мурадян, А.Я. Значимость коронавирусной инфекции в острой респираторной патологии у детей / Мурадян А.Я., Осидак Л.В., Румель Н.Б., Кореняко И.Е. // *Детские инфекции*. – 2003. – Т. 3. – С. 22-25.
606. Kesheh, M.M. An overview on the seven pathogenic human coronaviruses / M.M. Kesheh, P. Hosseini, S. Soltani, M. Zandi // *Reviews in Medical Virology*. – 2022. – Vol. 32. – № 2. – P. e2282. DOI: 10.1002/rmv.2282.
607. Яцышина, С.Б. Анализ циркуляции коронавирусов человека / С.Б. Яцышина, М.В. Мамошина, О.Ю. Шипулина, А.Т. Подколзин // *Вопросы вирусологии*. – 2020. – Т. 65. – № 5. – С. 267-276.
608. Abdul-Rasool, S. Understanding Human Coronavirus HCoV-NL63 / S. Abdul-Rasool, B.C. Fielding // *The Open Virology Journal*. – 2010. – Vol. 4. – P. 76-84. DOI: 10.2174/1874357901004010076.
609. Jevšnik, M. Coronavirus infections in hospitalized pediatric patients with acute respiratory tract disease / M. Jevšnik, T. Uršič, N. Zigon [et al.] // *BMC infectious diseases*. – 2012. – Vol. 12. – P. 365. DOI: 10.1186/1471-2334-12-365.
610. Лободанов, С.А. Исследование видовой структуры риновирусов и коронавирусов, циркулировавших в Московском регионе в период с 2007 по 2012 г. / С.А. Лободанов, И.С. Киселев, Ю.И. Аммур, А.Е. Горбаленя, Е.С.И. Клаас, В.В. Зверев, Е.Б. Файзулов // *Вопросы вирусологии*. – 2015. – Т. 60. – № 3. – С. 31-36.
611. Лободанов, С.А. Этиология ОРВИ: новые аспекты / С.А. Лободанов, Е.Б. Файзулов, А.А. Никонова, Ю.И. Забияка, А.Н. Каира, В.В. Зверев // *Санитарный врач*. – 2011. – № 10. – С. 49-52.
612. Лободанов, С.А. Роль риновирусов и коронавирусов в этиологии ОРВИ. / С.А. Лободанов, А.А. Никонова, Г.М. Полухина, Ю.И. Забияка, Ф.Э. Фильченкова, А.Н. Каира, В.В. Зверев, Е.Б. Файзулов // *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН*. – 2011. – № 3(79). – С. 156-167.
613. Ohtawara, M. Inability of Japanese rubella vaccines to induce antibody response in rabbits is due to growth restriction at 39 degrees C / M. Ohtawara, F. Kobune, Y. Umino, A. Sugiura // *Archives of Virology*. – 1985. – Vol. 83. – № 3-4. – P. 217-227. DOI: 10.1007/BF01309918.
614. Linnemann, C.C. Stability of the rabbit immunogenic marker of RA 27-3 rubella vaccine virus after human passage / C.C. Linnemann, L. Hutchinson, T.C. Rotte [et al.] // *Infection and Immunity*. – 1974. – Vol. 9. – № 3. – P. 547-549. DOI: 10.1128/iai.9.3.547-549.1974.

615. Zhou, Y. Identification of a Ca<sup>2+</sup>-binding domain in the rubella virus nonstructural protease / Y. Zhou, W.-P. Tzeng, W. Yang [et al.] // *Journal of Virology*. – 2007. – Vol. 81. – № 14. – P. 7517-7528. DOI: 10.1128/JVI.00605-07.

616. Lulla, V. Identification of mutations causing temperature-sensitive defects in Semliki Forest virus RNA synthesis / V. Lulla, A. Merits, P. Sarin [et al.] // *Journal of Virology*. – 2006. – Vol. 80. – № 6. – P. 3108-3111. DOI: 10.1128/JVI.80.6.3108-3111.2006.

617. Дмитриев, Г.В. Выявление маркеров аттенуации отечественного холодоадаптированного штамма С-77 вируса краснухи / Г.В. Дмитриев, Ю.И. Забияка, Е.Б. Файзулов, Т.К. Борисова, Р.Г. Десяткова, В.В. Зверев // *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. – 2012. – № 1. – С. 69-72.

618. Дмитриев, Г.В., Борисова Т.К., Файзулов Е. Б., Забияка Ю.И., Десяткова Р.Г., Зверев В.В. / Изучение молекулярных механизмов аттенуации вируса краснухи на примере отечественного штамма С-77 / Г.В. Дмитриев, Т.К. Борисова, Е.Б. Файзулов, Ю.И. Забияка, Р.Г. Десяткова, В.В. Зверев // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. – 2012. – № 3. – С. 28-34.

619. COVID-19 vaccine tracker and landscape. – Mode of access: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> (date of access: 18.10.2024). – [Electronic resource].

620. Miao, J. Syrian Hamster as an Animal Model for the Study on Infectious Diseases / J. Miao, L.S. Chard, Z. Wang, Y. Wang // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 2329. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02329.

621. Pollard, A.J. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments / A.J. Pollard, E.M. Bijker // *Nature Reviews. Immunology*. – 2021. – Vol. 21. – № 2. – P. 83-100. DOI: 10.1038/s41577-020-00479-7.

622. Alexandrova, G.I. Rev. Roum. /nframicrobiol. / G.I. Alexandrova, A.A. Smorodinstev // Obtaining of an additionally attenuated vaccinating cryophil influenza strain. – 1965. – № 2. – P. 197.

623. Maassab, H.F. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees c / H.F. Maassab // *Nature*. – 1967. – Vol. 213. – № 5076. – P. 612-614. DOI: 10.1038/213612a0.

624. Lu, X. Cross-protective immunity in mice induced by live-attenuated or inactivated vaccines against highly pathogenic influenza A (H5N1) viruses / X. Lu, L.E. Edwards, J.A. Desheva [et al.] // *Vaccine*. – 2006. – Vol. 24. – № 44-46. – P. 6588-6593. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.05.039.

625. Rudenko, L.G. Efficacy of live attenuated and inactivated influenza vaccines in schoolchildren and their unvaccinated contacts in Novgorod, Russia / L.G. Rudenko, A.N. Slepshkin, A.S. Monto [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1993. – Vol. 168. – № 4. – P. 881-887. DOI: 10.1093/infdis/168.4.881.



626. Menachery, V.D. Attenuation and restoration of severe acute respiratory syndrome coronavirus mutant lacking 2'-O-methyltransferase activity / V.D. Menachery, B.L. Yount, L. Josset [et al.] // *Journal of Virology*. – 2014. – Vol. 88. – № 8. – P. 4251-4264. DOI: 10.1128/JVI.03571-13.

627. Bauer, L. The neuroinvasiveness, neurotropism, and neurovirulence of SARS-CoV-2 / L. Bauer, B.M. Laksono, F.M.S. de Vrij [et al.] // *Trends in Neurosciences*. – 2022. – Vol. 45. – № 5. – P. 358-368. DOI: 10.1016/j.tins.2022.02.006.

628. Файзулоев, Е.Б. Однократная интраназальная иммунизация аттенуированным Ухань-подобным SARS-CoV-2 обеспечивает высокоэффективную перекрёстную защиту от заражения вариантами Delta и Omicron / Е.Б. Файзулоев, А.В. Грачева, Е.Р. Корчевая, Ю.И. Аммур, Д.И. Смирнова, Д.М. Хохлова, А.О. Дроков, А.А. Панкратов, Г.В. Трунова, В.А. Хохлова, М.С. Воронцова, И.А. Ленева, О.А. Свитич, В.В. Зверев // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2024. – Т. 101. – № 1. – С. 36-51. DOI: 10.36233/0372-9311-496.

629. Rath, S.L. Investigation of the Effect of Temperature on the Structure of SARS-CoV-2 Spike Protein by Molecular Dynamics Simulations / S.L. Rath, K. Kumar // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2020. – Vol. 7. – P. 583523. DOI: 10.3389/fmolb.2020.583523.

630. Sutter, R.W. The new polio eradication end game: rationale and supporting evidence / R.W. Sutter, L. Platt, O. Mach [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 210 Suppl 1. – P. S434-438. DOI: 10.1093/infdis/jiu222.

631. Flacco, M.E. Risk of SARS-CoV-2 Reinfection 18 Months After Primary Infection: Population-Level Observational Study / M.E. Flacco, G. Soldato, C. Acuti Martellucci [et al.] // *Frontiers in Public Health*. – 2022. – Vol. 10. – P. 884121. DOI: 10.3389/fpubh.2022.884121.

632. O Murchu, E. Quantifying the risk of SARS-CoV-2 reinfection over time / E. O Murchu, P. Byrne, P.G. Carty [et al.] // *Reviews in Medical Virology*. – 2022. – Vol. 32. – № 1. – P. e2260. DOI: 10.1002/rmv.2260.

633. Pulliam, J.R.C. Increased risk of SARS-CoV-2 reinfection associated with emergence of Omicron in South Africa / J.R.C. Pulliam, C. van Schalkwyk, N. Govender [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. – 2022. – Vol. 376. – № 6593. – P. eabn4947. DOI: 10.1126/science.abn4947.

634. Gracheva, A.V. Immunogenic properties of SARS-CoV-2 inactivated by ultraviolet light / A.V. Gracheva, E.R. Korchevaya, Y.I. Ammour, D.I. Smirnova, O.S. Sokolova, G.S. Glukhov, A.V. Moiseenko, I.V. Zubarev, R.V. Samoilkov, I.A. Leneva, O.A. Svitich, V.V. Zverev, E.B. Faizuloev // *Archives of Virology*. – 2022. – Vol. 167. – № 11. – P. 2181-2191. DOI: 10.1007/s00705-022-05530-7.

635. Файзулоев, Е.Б. Биологическая характеристика холодоадаптированных вариантов коронавируса SARS-CoV-2 / Е.Б. Файзулоев, Е.Р. Корчевая, А.В. Грачева, Р.В. Самойликов, Д.И. Смирнова, О.С. Соколова, Г.С. Глухов, А.В. Моисеенко, И.А. Ленева, Ф.Г. Нагиева, О.А.

Свитич, В.В. Зверев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2022. – Т. 99. – № 4. – С. 397-409. DOI: 10.36233/0372-9311-280.

636. Грачева, А.В. Адаптация МТТ-теста для определения нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 / А.В. Грачева, Е.Р. Корчевая, А.М. Кудряшова, О.В. Борисова, О.А. Петруша, Д.И. Смирнова, И.Н. Чернышова, О.А. Свитич, В.В. Зверев, Е.Б. Файзулов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2021. – Т. 98. – № 3. – С. 253-265. DOI: 10.36233/0372-9311-136.

637. Грачева, А.В. Маркеры аттенуации холодоадаптированных вариантов коронавируса SARS-CoV-2 / А.В. Грачева, Е.Р. Корчевая, Р.В. Самойликов, Д.И. Смирнова, И.А. Ленева, А.А. Поромов, А.А. Панкратов, Г.В. Трунова, В.А. Хохлова, Ф.Г. Нагиева, О.А. Свитич, В.В. Зверев, Е.Б. Файзулов // Медицинский академический журнал. – 2022. – Т. 22. – № 2. – С. 79-88. DOI: 10.17816/MAJ108725.

638. Ленева, И.А. Сравнительное изучение Ухань-подобного и омикрон-подобного вариантов SARS-CoV-2 на экспериментальных животных моделях / И.А. Ленева, Д.И. Смирнова, Н.П. Карташова, А.В. Грачева, А.В. Иванина, Е.А. Глубокова, Е.Р. Корчевая, А.А. Панкратов, Г.В. Трунова, В.А. Хохлова, О.А. Свитич, В.В. Зверев, Е.Б. Файзулов // Вопросы вирусологии. – 2022. – Т. 67. – № 5. – С. 439-449. DOI: 10.36233/0507-4088-135.

639. Грачева, А.В. Вирулентность и тканевая специфичность разных эпидемически значимых вариантов SARS-CoV-2 для золотистых сирийских хомячков / А.В. Грачева, А.О. Дроков, Д.И. Смирнова, Д.М. Хохлова, Е.Р. Корчевая, А.А. Панкратов, Г.В. Трунова, В.А. Хохлова, М.С. Воронцова, И.А. Ленева, О.А. Свитич, В.В. Зверев, Е.Б. Файзулов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2024. – Т. 101. – № 4. – С. 470-482.

640. Грачева, А.В. Вирулентность, иммуногенность и протективная активность холодоадаптированного омикрон-подобного штамма SARS-CoV-2 / А.В. Грачева, Д.М. Хохлова, Е.Р. Корчевая // Материалы XVI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены. – Екатеринбург : ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, 2024. – С. 35-37.

**ПРИЛОЖЕНИЕ А.** Таксономическая принадлежность и обозначения вирусов, упоминаемых в диссертации

Отряд*	Семейство*	Вид*	Общепринятое название вируса (англ.)	Название вируса, используемое в диссертации	Сокращенное название вируса
<i>Nidovirales</i>	<i>Coronaviridae</i>	<i>Betacoronavirus pandemicum</i>	Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus	Коронавирус ТОРС	SARS-CoV-1
		<i>Betacoronavirus pandemicum</i>	Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2	Новый коронавирус	SARS-CoV-2
		<i>Betacoronavirus cameli</i>	Middle East respiratory syndrome-related coronavirus	Коронавирус БВРС	MERS-CoV
		<i>Betacoronavirus gruedinensis</i>	Human coronavirus OC43	Коронавирус человека OC43	HCoV-OC43
		<i>Betacoronavirus hongkongense</i>	Human coronavirus HKU1	Коронавирус человека HKU1	HCoV-HKU1
		<i>Alphacoronavirus chicaoense</i>	Human coronavirus 229E	Коронавирус человека 229E	HCoV-229E
		<i>Alphacoronavirus amsterdamense</i>	Human coronavirus NL63	Коронавирус человека NL63	HCoV-NL63
<i>Articulavirales</i>	<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Alphainfluenzavirus influenza</i>	Influenza A virus	Вирус гриппа А	ВГрА
		<i>Betainfluenzavirus influenza</i>	Influenza B virus	Вирус гриппа В	ВГрВ
		<i>Gammainfluenzavirus influenzae</i>	Influenza C virus	Вирус гриппа С	ВГрС

## Продолжение Таблицы

<i>Mononegavirales</i>	<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Respirovirus laryngotracheitidis</i>	Human parainfluenza virus 1	Вирус парагриппа 1 типа	ВПГ-1
		<i>Respirovirus pneumoniae</i>	Human parainfluenza virus 3	Вирус парагриппа 3 типа	ВПГ-3
		<i>Orthorubulavirus laryngotracheitidis</i>	Human parainfluenza virus 2	Вирус парагриппа 2 типа	ВПГ-2
		<i>Orthorubulavirus hominis</i>	Human parainfluenza virus 4	Вирус парагриппа 4 типа	ВПГ-4
	<i>Pneumoviridae</i>	<i>Orthopneumovirus hominis</i>	Respiratory syncytial virus	Респираторно-синцитиальный вирус	РСВ
		<i>Metapneumovirus hominis</i>	Human metapneumovirus	Метапневмовирус	МПВ
<i>Rowavirales</i>	<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus adami</i>	Human adenovirus A Human adenovirus B Human adenovirus C Human adenovirus D Human adenovirus E	Аденовирусы	АДВ
		<i>Mastadenovirus faecale</i>	Human adenovirus F		
		<i>Mastadenovirus russelli</i>	Human adenovirus G		

## Продолжение Таблицы

<i>Picornavirales</i>	<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus norwalkense</i>	Norovirus (Norwalk virus)	Норовирусы	НВ
		<i>Sapovirus sapporoense</i>	Sapovirus (Sapporo virus)	Саповирусы	СВ
	<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus alphacoxsackie</i>	Enterovirus A Enterovirus B Enterovirus C Enterovirus D	Энтеровирусы, эховирусы, вирусы Коксаки А и В	ЭВ
		<i>Enterovirus betacoxsackie</i>			
		<i>Enterovirus coxsackiepol</i>			
		<i>Enterovirus coxsackiepol</i>	Poliovirus	Полиовирусы	ПВ
		<i>Enterovirus alparhino</i>	Rhinovirus A	Риновирусы	РВ
		<i>Enterovirus betarhino</i>	Rhinovirus B		
		<i>Enterovirus cerhino</i>	Rhinovirus C		
	<i>Hepatovirus ahepa</i>	Hepatitis A virus	Вирус гепатита А	ВГА	
<i>Reovirales</i>	<i>Spinareoviridae</i>	<i>Orthoreovirus mammalis</i>	Mammalian orthoreovirus (Reovirus)	Реовирусы	ОРВ
	<i>Sedoreoviridae</i>	<i>Rotavirus alphagastroenteritidis</i>	Rotavirus A	Ротавирусы группы А	РВА
		<i>Rotavirus tritogastroenteritidis</i>	Rotavirus C	Ротавирусы группы С	РВС

## Продолжение Таблицы

<i>Stellavirales</i>	<i>Astroviridae</i>	<i>Mamastrovirus hominis</i>	Astrovirus	Астровирусы	АВ
<i>Hepelivirales</i>	<i>Matonaviridae</i>	<i>Rubivirus rubella</i>	Rubella virus	Вирус краснухи	-
	<i>Hepeviridae</i>	<i>Paslahepevirus balayani</i>	Hepatitis E virus	Вирус гепатита Е	ВГЕ
<i>Zurhausenvirales</i>	<i>Papillomaviridae</i>	<i>Alphapapillomavirus 5</i>	Human papillomavirus 26, 51, 82	Папилломавирусы человека 26, 51, 82	ВПЧ26, 51, 82
		<i>Alphapapillomavirus 6</i>	Human papillomavirus 53, 56, 66	Папилломавирусы человека 53, 56, 66	ВПЧ53, 56, 66
		<i>Alphapapillomavirus 7</i>	Human papillomavirus 18, 39, 45, 59, 68, 70	Папилломавирусы человека 18, 39, 45, 59, 68, 70	ВПЧ18, 39, 45, 59, 68, 70
		<i>Alphapapillomavirus 9</i>	Human papillomavirus 16, 31, 33, 35, 52, 58, 67	Папилломавирусы человека 16, 31, 33, 35, 52, 58, 67	ВПЧ16, 31, 33, 35, 52, 58, 67
		<i>Alphapapillomavirus 10</i>	Human papillomavirus 6, 11, 13, 44	Папилломавирусы человека 6, 11, 13, 44	ВПЧ6, 11, 13, 44
		<i>Alphapapillomavirus 11</i>	Human papillomavirus 73	Папилломавирус человека 73	ВПЧ73
<i>Piccovirales</i>	<i>Parvoviridae</i>	<i>Bocaparvovirus primate1</i> <i>Bocaparvovirus primate2</i> <i>Bocaparvovirus primate3</i>	Human bocavirus	Бокавирусы	БВ

\*Названия отрядов, семейств и видов вирусов представлены в соответствии с требованиями Международного комитета по таксономии вирусов [516]

**ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Паспорт и регистрационное удостоверение на набор реагентов  
«ОРВИ-Монитор»**

ЗАО «Синтол» г. Москва, ул. Тимирязевская, д.42, оф.352  
Тел/факс: (499) 977-7455 Тел.: (495) 506-7997  
e-mail: syntol@iab.ac.ru www.syntol.ru



**ПАСПОРТ № 242**

<b>Наименовани:</b>	<b>Набор реагентов «ОРВИ-монитор»</b>
<b>Описание:</b>	набор реагентов для дифференциального выявления нуклеиновых кислот 12 респираторных вирусов в клиническом материале методом мультиплексной обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени
<b>Номер серии:</b>	191011
<b>Дата изготовления:</b>	19.10.2011
<b>Голен до:</b>	19.10.2012
<b>Условия хранения:</b>	-(18-20) °C
<b>Сведения о НДС:</b>	ТУ-9398-001-57992145-2011

<b>КОМПОНЕНТЫ НАБОРА РЕАГЕНТОВ</b>			
<b>Наименование</b>	<b>Серия/ голен до</b>	<b>Требования ТУ</b>	<b>Результат</b>
ОТ	041011/ 04.01.13	Прозрачная бесцветная жидкость. 2 пробирки	соответствует
ОТ-смесь	041011/ 04.01.13	Прозрачная бесцветная жидкость, рН=8,6-9,0. 4 пробирки	соответствует
ПЦР-1	041011/ 04.01.13	Прозрачная жидкость светло-сиреневого цвета, рН=8,6-9,0. 2 пробирки	соответствует
ПЦР-2	041011/ 04.01.13	Прозрачная жидкость светло-сиреневого цвета, рН=8,6-9,0. 2 пробирки	соответствует
ПЦР-3	041011/ 04.01.13	Прозрачная жидкость светло-сиреневого цвета, рН=8,6-9,0. 2 пробирки	соответствует
ПЦР-4	041011/ 04.01.13	Прозрачная жидкость светло-сиреневого цвета, рН=8,6-9,0. 2 пробирки	соответствует
М-MuLV	051011/ 05.01.13	Прозрачная бесцветная жидкость. 1 пробирка	соответствует
Тақ ДНК-полимераза	060710/ 06.10.12	Прозрачная бесцветная жидкость. 1 пробирка	соответствует
ОКО	041011/ 04.01.13	Прозрачная бесцветная жидкость. 2 пробирки	соответствует
ПКО-1	141011/ 14.01.13	Сухое вещество белого цвета. 10 пробирок	соответствует
ПКО-2	141011/ 14.01.13	Сухое вещество белого цвета. 10 пробирок	соответствует
ПКО-3	141011/ 14.01.13	Сухое вещество белого цвета. 10 пробирок	соответствует
ПКО-4	141011/ 14.01.13	Сухое вещество белого цвета. 10 пробирок	соответствует
ПКО-разбавитель	270711/ 27.10.12	Прозрачная бесцветная жидкость, рН=7,8-8,2. 1 пробирка	соответствует
ВПК	101011/ 10.01.13	Сухое вещество белого цвета. 10 пробирок	соответствует
ВПК-разбавитель	041011/ 04.01.13	Прозрачная бесцветная жидкость, рН=7,8-8,2. 2 пробирки	соответствует

<b>ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ</b>		
<b>Показатель</b>	<b>Требования ТУ</b>	<b>Результат</b>
Специфическая активность и чувствительность	Набор реагентов должен обнаруживать НК вирусов гриппа А и В, вирусов парагриппа 1, 2, 3, 4 типов, респираторно-синциального вируса, риновирусов, энтеровирусов и коронавирусов с чувствительностью не более $1,0 \cdot 10^4$ ГЭ/мл, аденовирусов, бокавирусов с чувствительностью не более $2,0 \cdot 10^3$ ГЭ/мл и давать отрицательный результат с ДНК плаценты человека	соответствует

**Заключение:** Набор реагентов «ОРВИ-монитор» серии 191011 соответствует требованиям спецификации ТУ-ТУ-9398-001-57992145-2011.

Дата выдачи 19.10.11

Руководитель ОБТК \_\_\_\_\_ (Алексеев Я.И.)





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

## РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ № ФСР 2012/13218

от 19 марта 2012 года

Срок действия: не ограничен.

Настоящее удостоверение выдано

**Федеральное государственное бюджетное учреждение научного обслуживания Инновационно-технологический центр "Биологически активные соединения и их применение" Российской академии наук, Россия, 119991, Москва, ул.Губкина, д.3, стр.2**

и подтверждает, что изделие медицинского назначения

**Набор реагентов «ОРВИ-монитор» для дифференциального выявления нуклеиновых кислот 12 респираторных вирусов (вирусов гриппа А и В, вирусов парагриппа 1, 2, 3, 4 типов, аденовирусов, бокавирусов, респираторно-синцитиального вируса, риновирусов, энтеровирусов и коронавируса) в клиническом материале методом мультиплексной обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по ТУ 9398-001-57992145-2011 в составе (см.приложение на 1 листе):**  
производства

**Федеральное государственное бюджетное учреждение научного обслуживания Инновационно-технологический центр "Биологически активные соединения и их применение" Российской академии наук, Россия, 119991, Москва, ул.Губкина, д.3, стр.2**

класс потенциального риска 2а

ОКП 93 9816

соответствующее комплекту регистрационной документации

КРД № 48135 от 05.12.2011

приказом Росздравнадзора от 19 марта 2012 года № 1211-Пр/12

разрешено к производству, продаже и применению на территории Российской Федерации

**Врио руководителя Федеральной службы  
по надзору в сфере здравоохранения  
и социального развития**

**Е.А. Тельнова**  
016100





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

## ПРИЛОЖЕНИЕ К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ

Лист 1

№ ФСР 2012/13218

Комплект № 1 в составе:

1. Смесь праймеров для обратной транскрипции, ОТ- 1,15 мл (2 пробирки).
2. Реакционная смесь для проведения обратной транскрипции, ОТ-смесь - 1,2 мл (4 пробирки).
3. Смесь для проведения ПЦР №1, ПЦР-1 - 1,45 мл (2 пробирки).
4. Смесь для проведения ПЦР №2, ПЦР-2 - 1,45 мл (2 пробирки).
5. Смесь для проведения ПЦР №3, ПЦР-3 - 1,45 мл (2 пробирки).
6. Смесь для проведения ПЦР №4, ПЦР-4 - 1,45 мл (2 пробирки).
7. Обратная транскриптаза (50 ед/мкл), М-MuLV - 0,28 мл (1 пробирка).
8. ДНК Полимераза с антителами, ингибирующими активность фермента (5 ед/мкл), Taq ДНК-полимераза - 0,23 мл (1 пробирка).

Комплект № 2 в составе:

1. Отрицательный контрольный образец, ОКО - 0,9 мл (2 пробирки).
2. Пул положительных контрольных образцов №1, ПКО-1 - 0,2 мг (10 пробирок).
3. Пул положительных контрольных образцов №2, ПКО-2 - 0,2 мг (10 пробирок).
4. Пул положительных контрольных образцов №3, ПКО-3 - 0,2 мг (10 пробирок).
5. Пул положительных контрольных образцов №4, ПКО-4 - 0,2 мг (10 пробирок).
6. Раствор для разбавления ПКО, ПКО-разбавитель - 0,9 мл (1 пробирка).
7. Образец внутреннего положительного контроля, ВПК - 1 мг (10 пробирок).
8. Раствор для разбавления ВПК, ВПК-разбавитель - 0,9 мл (2 пробирки).

≠

Врио руководителя Федеральной службы  
по надзору в сфере здравоохранения  
и социального развития

19 марта 2012 года



Е.А. Тельнова

003138